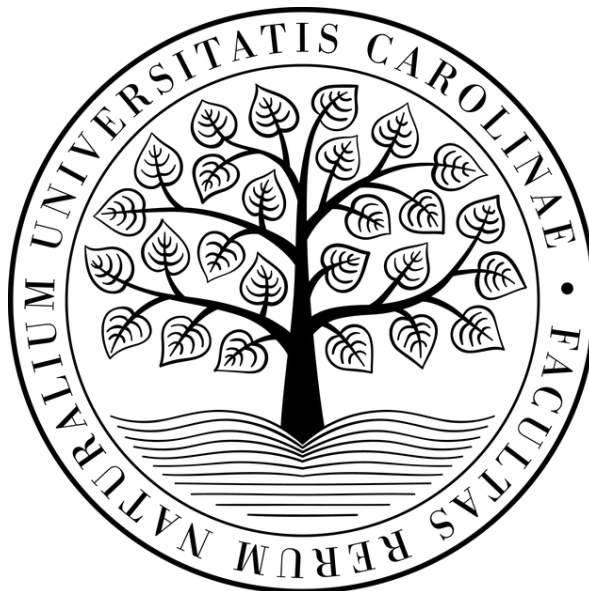


Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Pavlína Hucková

Úloha střevní mikroflóry v metabolismu léčiv a karcinogenů
Role of gut microflora in metabolism of drugs and carcinogens

Bakalářská práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, PhD.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 8. 2018

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady a připomínky k bakalářské práci během jejího zpracování. Také bych ráda poděkovala Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i, zejména Ing. Jakubovi Mrázkovi, PhD. a Chahrazed Mekadim, MSc. za pomoc při experimentální činnosti a zpracování výsledků.

Děkuji své rodině a kamarádům za poskytnuté zázemí a podporu.

Abstrakt

Střevní mikroflóru lze považovat za další velmi rozsáhlý orgán lidského těla, který stále není dostatečně prozkoumán. Jedná se o velmi složitý systém s mnoha funkcemi pro hostitelský organismus. Obsahuje velké množství bakterií, virů nebo archea. Střevní mikroflóra má důležité funkce v rozkladu potravin a metabolismu cizorodých látek. Cizorodé látky mohou mít pozitivní, ale i negativní vliv na bakterie střevní mikroflóry. Proto se výzkum zaměřuje na metabolismus těchto látek a zkoumá jejich vliv na onemocnění trávicího traktu. Studováno je také ovlivnění diverzity střevních bakterií, což může být důležité při medikaci pacientů.

Odebrané fekální vzorky (A, B, C) byly inkubovány v čase 0, 3 a 6 hodin ve dvou médiích (McDougallův pufr a BHI médium). Vzorky z inkubací byly analyzovány metodou RP-HPLC. Byla sledována degradace myricetinu a jeho případná přeměna na dihydromyricetin. Bylo zjištěno, že degradace myricetinu v průběhu 6 hodin byla u všech fekálních vzorků (A, B, C). Nedá se vyhodnotit, jaké médium bakteriím vyhovuje více, jelikož u jednoho fekálního vzorku (A) došlo k rychlejší degradaci myricetinu v McDougallově pufru, než v BHI médiu. Další fekální vzorek (B) naopak rychleji degradoval myricetin v BHI médiu a pomaleji v McDougallově pufru. U posledního fekálního vzorku (C) byla degradace v obou médiích téměř totožná. V žádném ze tří fekálních vzorků nedošlo k přeměně myricetinu na dihydromyricetin.

Fekální vzorky (A, B, C) byly inkubovány v průběhu 0 až 72 hodin ve dvou médiích. Fekální vzorky z inkubací byly analyzovány polymerázovou řetězovou reakcí a elektroforézou v denaturačním gradientovém gelu (PCR-DGGE). Bylo zjištěno, že flavonoidy přidané (myricetin či dihydromyricetin) k fekálním vzorkům mění složení bakterií ve vzorcích odebraných v 3, 6, 24 a 72 hodinách inkubace. Vzájemné rozdíly v kratších časech inkubace nejsou tak patrné, jako v čase 72 hodin. Efekt použitých médií nelze vyhodnotit, jelikož ke změně došlo, jak v McDougallově pufru, tak v BHI médiu. Závěrem je možno konstatovat, že myricetin i dihydromyricetin ovlivňují diverzitu *in vitro* inkubovaných fekálních bakterií.

Klíčová slova: střevní mikroflóra, myricetin, dihydromyricetin, metabolismus

Abstract

We can consider intestinal microflora as another large organ of human body, that isn't sufficiently explored yet. It is very complex system with many functions for host organism. It contains a large number of bacteria, viruses and archaea. Intestinal microflora has an important function on food decomposition and metabolism of foreign substances. Foreign substances has a positive or negative effect on intestinal bacteria. That's why the research focuses on metabolism of these substances and their effect on digestive tract disease. Research also focus at intestinal bacteria diversity which may be important in treating patients.

Fecal samples (A, B, C) was incubated at time 0, 3 and 6 hours in two mediums (McDougall buffer and BHI medium). Incubated samples was analyzed by RP-HPLC method. Focus was on degradation of myricetin and his potential transformation into dihydromyricetin. Research proved, that degradation myricetin in 6 hours was at every fecal sample (A, B, C). It can not be evaluated what medium is best for the bacteria because in first fecal sample (A) there was a faster degradation myricetin in McDougallov's buffer then in BHI medium. Another sample (B) on the others side reacted faster in BHI medium then in McDougallov's buffer. The last sample (C) occurred practically same degradation for both methods. There was no transformation myricetin to dihydromyricetin transformation in tested samples.

Fecal samples (A, B, C) was incubated during 0 to 72 hours in two mediums. Fecal samples from incubation was analyzed by polymerase chain reaction and by denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Results shown, that by adding flavonoids (myricetin or dihydromyricetin) to fecal samples we changed composition of bacterias in samples taken in 3, 6, 24 and 72 hours of incubation. Differences in short incubation timers are quite small beside samples with longer incubation. There was a transformation in both mediums - McDougallov's buffer and BHI medium. At last we can say that both myricetin and dihydromyricetin affect diversity *in vitro* incubated fecal bacterias.

Keywords: intestinal microflora, myricetin, dihydromyricetin, metabolism

(In Czech)

Obsah

1	Seznam zkratk	1
2	Úvod.....	2
2.1	Střevní mikroflóra	2
2.1.1	Typy střevních bakterií	3
2.1.2	Funkce střevní mikroflóry	3
2.2	Ovlivnění metabolismu cizorodých látek střevní mikroflórou	4
2.3	Látky ovlivňující složení střevní mikroflóry.....	5
2.4	Nemoci spojené se změnami složení střevní mikroflóry	6
2.5	Flavonoidy a jejich metabolismus střevní mikroflórou	7
2.5.1	Flavonoidy	7
2.5.2	Příjem a metabolismus flavonoidů	9
2.5.3	Myricetin.....	12
2.5.4	Dihydromyricetin.....	13
3	Cíl práce.....	15
4	Materiál a metody	16
4.1	Materiál	16
4.1.1	Použité chemikálie.....	16
4.1.2	Použité přístroje	17
4.2	Metody	20
4.2.1	Anaerobní kultivace flavonoidů s fekálními bakteriemi.....	20
4.2.2	Extrakce myricetinu	21
4.2.3	HPLC na reverzní fázi	22
4.2.4	Izolace bakteriální DNA	23
4.2.5	PCR-DGGE metoda.....	24

4.2.6	Purifikace bakteriální DNA	30
5	Výsledky	31
5.1	Degradace MYR bakteriemi střevní mikroflóry	31
5.2	Vliv flavonoidů na diverzitu fekálních bakterií	41
5.2.1	Ovlivnění bakteriální diverzity MYR	41
5.2.2	Ovlivnění bakteriální diverzity DHM	45
6	Diskuse	48
7	Souhrn	52
8	Seznam literatury	53

1 Seznam zkratek

APS	peroxodisíran amonný
BHI	BHI médium (z angl. brain-heart infusion)
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (z angl. denaturing gradient gel electrophoresis)
DHM	dihydromyricetin
DMN	negativní kontrola – dihydromyricetin
DMY	vzorky obsahující dihydromyricetin
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
GIT	gastrointestinální trakt
McD.	McDougallův pufr
MN	negativní kontrola – myricetin
MY	vzorky obsahující myricetin
MYR	myricetin
O-DMA	<i>O</i> -desmethylangolensin
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (z angl. reverse phase high-performance liquid chromatography)
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
SCFAs	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z angl. short-chain fatty acids)
TAE	tris-acetátový pufr
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
TFA	kyselina trifluorooctová (z angl. trifluoroacetic acid)

2 Úvod

Lidský organismus je osídlen mnoha mikroorganismy. Na lidském těle se nachází mikroflóra kůže, kterou osidlují gram-pozitivní koky (např. *Staphylococcus epidermidis*), nebo gram-pozitivní tyčinky (např. *Propionibacterium acnes*). Další mikroorganismy se nacházejí v uších, v dýchacích cestách, v močových cestách, v pochvě a v ústech. Nejpočetnější mikroflóra lidského těla se však nachází ve střevech.

2.1 Střevní mikroflóra

Střevní mikroflóru lze přirovnat k velmi rozsáhlému ekosystému, ve kterém se vyskytují jak aerobní, tak i anaerobní mikroorganismy. Střevní mikroflóru tvoří mnoho druhů různých bakterií [1]. Mikroflóra nacházející se na povrchu těla osidluje kůži. Povrch kůže není jednotně pokrytý stejnými druhy bakterií, například na suchých výklencích (loktech) se jich nachází minimální množství a v podpaží je jich naopak nesčetné množství [2]. To samé platí i o distribuci střevní mikroflóry, jelikož v každé části střeva se nacházejí různé druhy bakterií. Ve střevním mikrobiomu se nacházejí různé mikroorganismy, archea, viry a některá jednobuněčná eukaryota [2].

Mikroorganismy začínají osidlovat naše tělo hned po narození, jelikož v těle matky je plod naprosto sterilní. Výsledky současných studií naznačují, že problém s osidlováním novorozenců mikroorganismy souvisí se vznikem alergií a dalších nemocí. Každý novorozenec je jinak osidlován a kolonizují ho různé druhy mikroorganismů. Záleží i na tom, zda byl porod veden přirozenou cestou, nebo císařským řezem. Při klasickém porodu přichází dítě nejprve do styku s vaginální mikroflórou matky a zastoupení mikroorganismů je vyšší než při porodu císařským řezem [3]. Například při porodu císařským řezem má novorozenec ve střevech nižší zastoupení *Bacteroides* a *Bifidobacterie* než novorozenec narozený přirozenou cestou [4].

Osidlování těla mikroorganismy je následně ovlivňováno v průběhu celého života, například dietami, tělesnou aktivitou, cestováním, onemocněním, hormonálními cykly nebo terapeutickým zásahem. U zdravých dospělých jedinců je mikrobiom velmi stabilní [5]. Tato stabilita bakterií závisí nejvíce na stravě, protože stravou se dostává do našeho těla mnoho mikroorganismů, ale také stravou některé mikroorganismy můžeme eliminovat. Toto ovlivňování se děje, například při přechodu z nízkotučné stravy na stravu i bohatou

na tuky, nebo při příjmu jednoduchých cukrů [6]. Ukazuje se, že se zdraví jedinci od sebe liší obsahem mikroorganismů na kůži, ve střevech nebo i v pochvě [7]. Střevní mikroflóra obsahuje více jak 1000 bakteriálních druhů, které jsou spojeny s možnou expresí miliónů genů. Ovlivňují vývoj imunitního systému, trávení, ale i detoxikační reakce organismu [5].

2.1.1 Typy střevních bakterií

Ve střevní mikroflóře se nacházejí bakterie fakultativně anaerobní, ale také striktně anaerobní. Mezi fakultativně anaerobní bakterie patří rody *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterie*. Do striktně anaerobních bakterií řadíme rody *Bacteriodes*, *Clostridium* a *Enterobacterium* [8]. U dospělých jedinců převažují ve střevech především bakterie rodu *Bacteriodes*, *Eubacterium*, *Clostridium* a *Bifidobacterium* [9].

Zkoumání těchto bakteriálních druhů se z počátku provádělo kultivací, při které se zjistilo, že velká většina bakterií, obsažených ve střevech, jsou nekultivovatelné. Při kultivaci nedokážeme napodobit podmínky, které by jim vyhovovaly (anaerobní prostředí, pH, kultivační médium). Další problém při zkoumání střevních bakterií může spočívat v tom, že se studuje pouze část bakteriálních druhů, které vyjdou ven z těla s nestravitelnou potravou. Zkoumání tedy nezahrnuje celý obsah střev. Proto se přešlo k metodě využívající identifikaci bakterií sekvenováním části bakteriální 16S rRNA (ribosomální RNA). Sekvenování tohoto genu je výhodné, jelikož 16S rRNA se vyskytuje ve všech bakteriích a obsahuje vysoce variabilní oblasti umožňující snadné rozlišení těchto genů [10]. Díky tomu se sekvenováním podařilo objasnit a potvrdit některé druhy bakterií střevní mikroflóry, které v trávení hrají dominantní roli. Ovšem značná část zjištěných sekvencí neodpovídá doposud známým mikroorganismům, proto je tato problematika dále usilovně studována [11]. Se sekvenováním genů se začalo využívat i molekulárně biologických metod. Jedna z nejvýznamnějších molekulárně biologických metod je metoda polymerázové řetězové reakce (PCR, z anglického „polymerase chain reaction“). Metoda PCR ve spojení s elektroforézou v denaturačním gradientovém gelu (DGGE, z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“) tvoří základ pro úspěšnou identifikaci bakterií ve střevní mikroflóře [12].

2.1.2 Funkce střevní mikroflóry

Střevní mikroflóra má nezastupitelné funkce pro lidský organismus. Mikroorganismy v ní obsažené nám poskytují například vitamín K, vitamín B₁₂, biotin,

thiamin, nebo kyselinu listovou [13]. Bakterie střevní mikroflóry mohou fermentovat vlákninu, která je pro člověka nestravitelná. Tuto nestravitelnou vlákninu bakterie transformují na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs, z angl. „short-chain fatty acids“). Mezi SCFA řadíme acetát, propionát, nebo butyrát. SCFAs mohou být zdrojem energie pro střevní enterocyty [14]. SCFAs interagují se specifickými povrchovými SCFAs receptory ve střevech a dochází k regulaci zánětlivých a rakovinných procesů ve střevech a dalších nemocí (alergické reakce, kardiovaskulární onemocnění). Proto receptory pro SCFA můžeme označit jako možné místo terapeutického zásahu, který by vedl k udržení stálosti střevního prostředí [15]. Ve střevní mikroflóře jsou bakterie, které pozitivně, ale i negativně ovlivňují její činnost. Například *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides fragilis*, nebo známá *Escherichia coli* pozitivně ovlivňují činnost střevní mikroflóry. Tyto bakterie pomáhají při biotransformaci žlučových kyselin a následném trávení lipidů [16].

2.2 Ovlivnění metabolismu cizorodých látek střevní mikroflórou

Ovlivnění metabolismu cizorodých látek střevní mikroflórou nebylo v minulosti příliš zkoumaným tématem. Této problematice se nikdy moc pozornosti nevěnovalo, protože se neuvažovalo, že by střevní mikroflóra mohla přeměňovat cizorodé látky, léčiva, nebo kombinaci léčiv na toxické. Této problematice bylo věnováno pozornosti až po úmrtí osmnácti lidí v Japonsku. Zjistilo se, že podávané léčivo Sorivudin, spíše jeho metabolit 5-(2-bromvinyl)uracil reaguje s 5-fluorouracil. Látka 5-fluorouracil byla podávána pacientům ve formě protirakovinového léku Tegafur. Metabolit 5-(2-bromvinyl)uracil inhiboval 5-fluorouracil a ten se akumuloval do různých tkání, především do kostní dřeně a do sliznice střevní membrány, a dochází k překročení jeho toxické hladiny. Interakci těchto látek a možnou příčinu úmrtí zkoumali na myších, kterým byly podávány tyto látky [17].

Orálně podávané látky mohou být metabolizovány ještě před vstupem do gastrointestinálního traktu (GIT), například v ústech. Běžnější je látky metabolizovat až střevní mikroflórou. Metabolismus látek střevní mikroflórou je ovlivňován rychlostí absorpce. Metabolismus také závisí na rozdílném zastoupení střevních mikroorganismů v celém GIT. Hojně zastoupené jsou v distální části tenkého střeva a v tlustém střevě.

Léčiva a jejich metabolity mohou být metabolizovány a vyloučeny žlučí do střeva a odsud reabsorbovány do enterohepatálního oběhu [18], [19].

Cizorodé látky, které jsou metabolizovány střevní mikroflórou, mají různou chemickou strukturu. I přes tuto rozmanitost a odlišnost byly ve střevech zjištěny dva základní typy chemických reakcí. Mezi základní typy reakcí, kterými jsou přeměňovány cizorodé látky střevní mikroflórou, řadíme redukční reakce a reakce hydrolytické [20].

Redukčním reakcím ve střevní mikroflóře mohou podléhat léčiva jako například digoxin, 5-fluorouracil, sulfasalazin, prontosil a neprontosil. U sulfosalazinu byl popsán mechanismus redukce jeho azoskupiny za vzniku 5-aminosalicylové kyseliny a sulfapyridinu. Kyselina 5-aminosalicylová je jeho aktivní metabolit zatímco sulfapyridin může způsobovat nežádoucí vedlejší účinky, jako je bolest hlavy, závratě, nechutenství, nebo kožní vyrážka [18], [21].

Hydrolytické reakce jsou pro bakterie velmi důležité, jelikož těmito reakcemi získávají látky, které slouží k buněčnému růstu. Hydrolytické reakce katalyzují hydrolytické enzymy, které jsou produkovány některými bakteriemi střevní mikroflóry. Mezi nejznámější enzym patří β -glukuronidasa. Než dojde k detoxikaci xenobiotik, musí být xenobiotika biotransformována. Enzym katalyzující vazbu mezi daným xenobiotikem a kyselinou glukuronovou se nazývá UDP-glukuronosyltransferasa. Dochází tak ke zvýšení hydrofility xenobiotik a následné exkreci do střeva, kde na něj působí bakteriální β -glukuronidasa. Uvolněné xenobiotikum může být absorbováno zpět do těla [22].

2.3 Látky ovlivňující složení střevní mikroflóry

Jako probiotiky jsou označovány zdraví prospěšné bakterie, které mohou ovlivňovat střevní mikroflóru. Probiotika se podávají, pokud potřebujeme obnovit střevní mikroflóru. Naopak prebiotika jsou látky tělu nestravitelné, které pomáhají podporovat růst prospěšných bakterií a vytvářejí jim tak vhodné podmínky [23].

Pozitivně ovlivňují střevní mikroflóru probiotika, prebiotika, nebo kombinace těchto látek. Aby probiotická a prebiotická látka působila na organismus pozitivně, musí být dávkování ve správném množství. Pokud by došlo k předávkování těmito látkami, tak mohou mít negativní účinek např. průjemy. Jako probiotická léčiva se nejčastěji používají bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*). Mohou se též využívat

nejrůznější enterokoky, nebo kvasinky. Tato probiotická léčiva mají příznivý vliv na vývoj a stabilitu střevní mikroflóry, stimulují jak nespecifické, tak i specifické složky imunitního systému [23].

V současnosti negativně ovlivňují střevní mikroflóru hlavně antibiotika. Antibiotická léčiva byla vyvinuta, aby usmrtila či zabránila růstu patogenním bakteriím. Antibiotika rozdělujeme na úzkospektrální a širokospektrální. Širokospektrální antibiotika snižují bakteriální rozmanitost ve střevní mikroflóře. Mezi antibiotika ovlivňující střevní mikroflóru patří např. ciprofloxacin [24]. Ve studii [25] zjistili, že pokud se ciprofloxacin užívá pět dnů, dojde ve střevě k ovlivnění asi třetiny bakteriálních taxonů. Účinek antibiotik na bakteriální kmeny se u jednotlivců lišil. Po vysazení antibiotik pozorovali, že složení střevní mikroflóry se po čtyřech týdnech velmi podobá složení mikroflóry před zahájením léčby. Avšak některé bakteriální kmeny nebyly obnoveny ani po šesti měsících od vysazení ciprofloxacinu.

Antibiotika nemusí nutně snižovat množství bakterií ve střevní mikroflóře, ale naopak je mohou zvyšovat. V další studii, kde byl sledován pozitivní efekt antibiotik na růst bakterií, bylo zjištěno, že podáváním ampicilinu dochází k ovlivnění střevní mikroflóry. A to tak, že pozitivně působí na růst bakteriálních kmenů *Bacteroidetes*. Ampicilin narušuje syntézu buněčné stěny u gram-pozitivních bakterií a dochází k narušení membrány. Bylo zjištěno, že některá antibiotika mohou měnit genovou expresi střevních mikroorganismů [26].

2.4 Nemoci spojené se změnami složení střevní mikroflóry

Cílem zkoumání vlivu střevních bakterií na zdraví člověka je jejich ovlivnění a následné snížení výskytu nemocí. Už bylo prokázáno, že střevní bakterie hrají roli při rakovině, alergiích, obezitě, kardiovaskulárních onemocněních, ateroskleróze, diabetu mellitu 1. typu, nebo u zánětlivého onemocnění střev. Ve studii [27] pozorovali vliv střevní mikroflóry na obezitu myši. V experimentu použili myši, které byly geneticky obézní a gnotobiologické myši (myš chovaná v izolaci, která nemá mikrobiom). Bylo zjištěno, že po velmi krátké době byly gnotobiologické myši osídleny střevními mikroorganismy z obézních myši. A zároveň zjistili, že i přes nízké dávky potravy u gnotobiologických myši došlo k 40% zvýšení tělesného tuku.

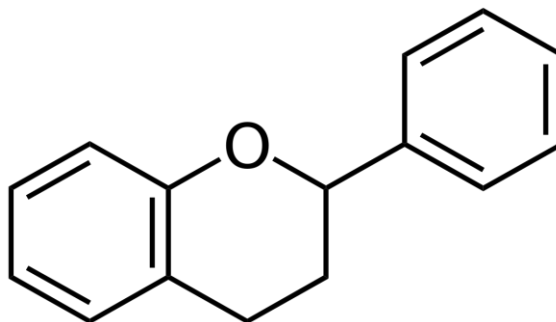
Bylo prokázáno, že hormony štítné žlázy mají určitý vliv na GIT. Mezi onemocnění štítné žlázy patří i tzv. „hyperfunkce štítné žlázy“, nebo-li hyperthyroidismus. Vliv hyperthyroidismu byl zkoumán na fekálních vzorcích od 14 dobrovolníků s touto poruchou a na fekálních vzorcích od 7 zdravých dobrovolníků. Bakteriální druhy v těchto vzorcích byly určované metodou PCR-DGGE, která umožňuje po elektroforetické separaci PCR produktů identifikaci části 16S rRNA ve vyříznutých zónách. Pomocí metody DGGE bylo zjištěno, že nemocní jedinci mají bohatší zastoupení bakteriálních druhů, než zdraví jedinci. U nemocných jedinců byly identifikovány například bakterie *Prevotella denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, které jsou součástí mikroflóry ústní dutiny a pravděpodobně vstoupily do trávicího traktu se slinami. *Fusobacterium nucleatum* se řadí mezi anaerobní bakterie a bylo prokázáno, že přispívá ke vzniku paradontálních onemocnění, ulcerózní kolitidy, nebo lokálním kožním vředům. To značí, že u lidí trpících poruchou štítné žlázy, může dojít ke vzniku těchto druhotných onemocnění. U zdravých jedinců byly nalezeny bakterie rodu *Firmicutes* a *Bacteroidetes* (*Bacteroides vulgatus*) a další bakterie běžně se vyskytující ve střevní mikroflóře. Zdraví jedinci měli vyšší zastoupení bakterií rodu *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, než nemocní. Snížení obsahu těchto bakterií může u nemocných vést ke zhoršené imunitní funkci. Oproti tomu nemocní jedinci s poruchou štítné žlázy měli vyšší počet bakterií rodu *Clostridium* a *Enterococcus* [28]–[31].

2.5 Flavonoidy a jejich metabolismus střevní mikroflórou

Každý den přijímáme v potravě mnoho cizorodých látek, které se nejčastěji přeměňují v GIT, ale i v játrech a enterocytech střev. Cizorodé látky tvoří velmi početnou skupinu pocházející ze živočišné a rostlinné stravy. V rostlinné stravě jsou zastoupeny především flavonoidy.

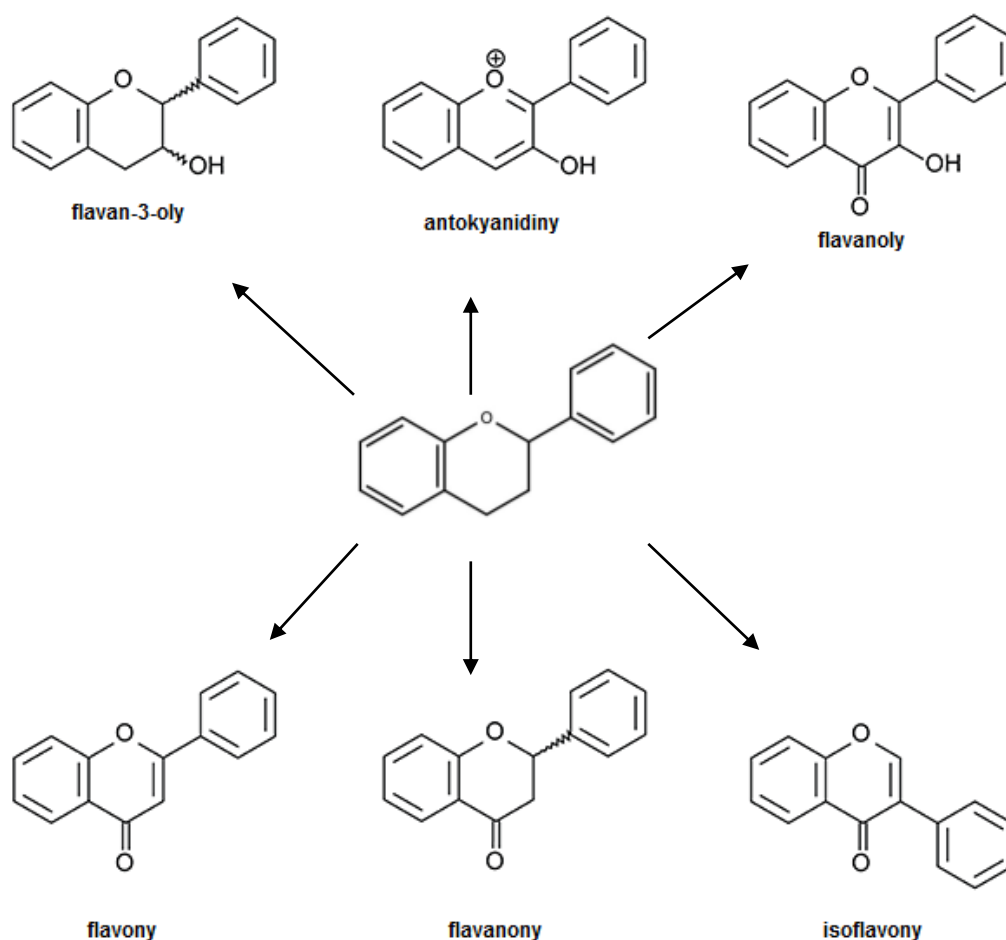
2.5.1 Flavonoidy

Flavonoidy jsou fenolické sloučeniny, obsahující ve struktuře flavanový skelet (Obrázek 1, strana 8). Systematickým názvem jsou 2-fenyl-1,4-benzopyron. Ten je tvořen 15 atomy uhlíku uskupených do 3 kruhů se strukturou C6-C3-C6, kde C3 je centrální heterocyklus obsahující kyslík. Podle druhu substituentů, polohy a počtu hydroxylových skupin na flavanovém skeletu je rozděluje do několika skupin. Mezi hlavní skupiny patří flavony, isoflavony, flavanony, flavan-3-oly, flavonoly a antokyanidiny (Obrázek 2, strana 9) [32], [33].



Obrázek 1: Struktura flavanu. Systematický název je 2-fenyl-1,4-benzopyron. Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

Je známo přes 8000 různých druhů flavonoidů, které jsou hojně zastoupeny v cévnatých rostlinách nejčastěji jako glykosidy [32]. Tyto sekundární metabolity se řadí mezi významné fenolické látky se silnými antioxidačními a chelatačními vlastnostmi, které jsou závislé právě na počtu a poloze hydroxylových skupin, ale i na povaze substituentů na aromatických kruzích [33], [34], [35].



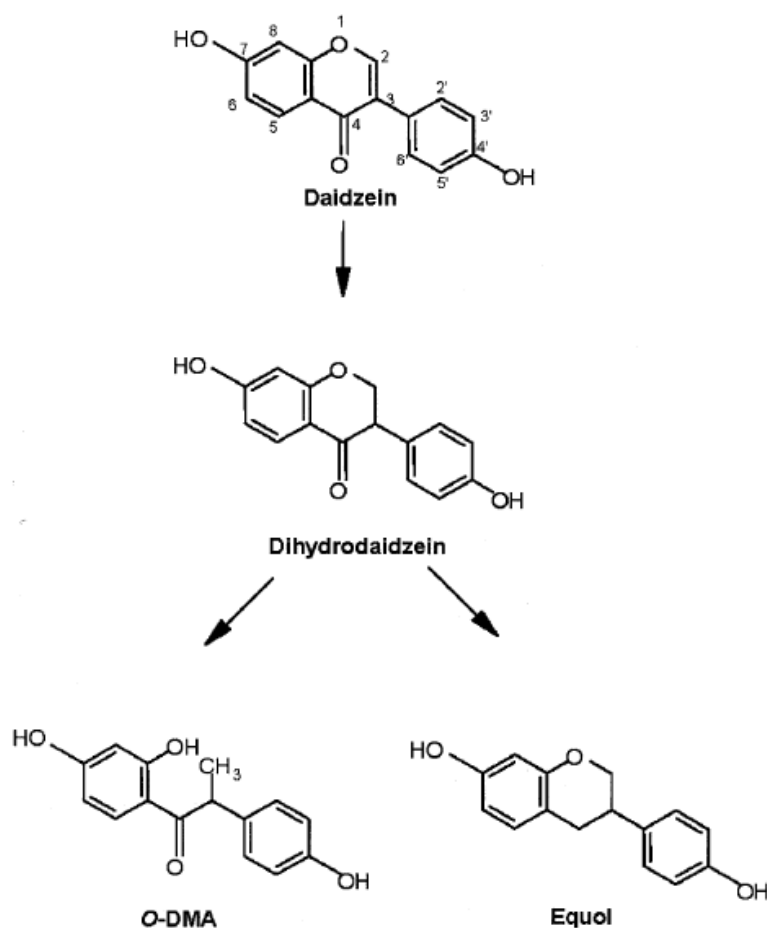
Obrázek 2: Struktury flavonoidů (převzato a upraveno z [36]).

2.5.2 Příjem a metabolismus flavonoidů

Lidé flavonoidní látky přijímají především v rostlinné stravě a v některých houbách. Jsou obsaženy v ovoci, zelenině, v kořeni, bylinných produktech, nebo ve vínu. Příjem flavonoidů se pohybuje v rozmezí 50 – 800 mg/den. Flavonoidy mohou být také přijímány v potravinových doplňcích, kde jsou obsaženy v rostlinných extraktech [32].

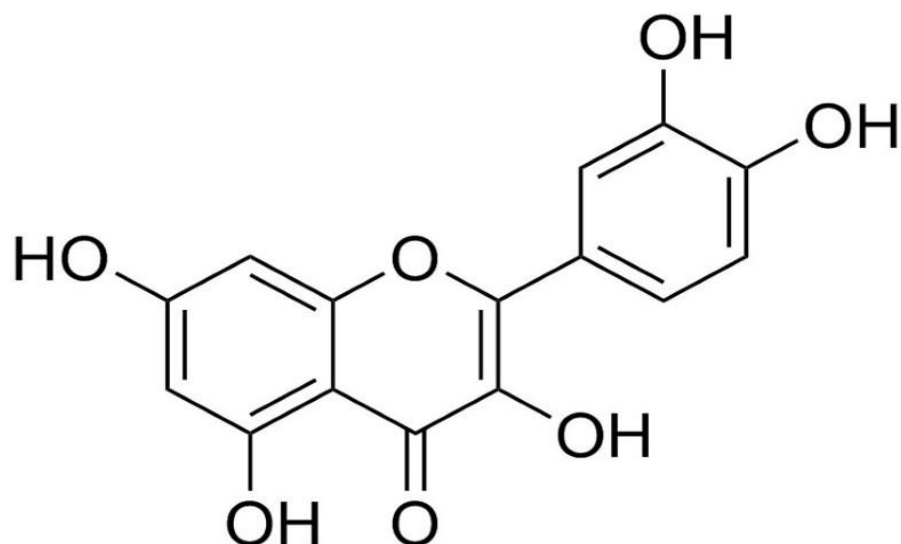
Jedním z flavonoidů, přesněji isoflavonoidů je daidzein. Daidzein se nachází v luštěninách, hlavně v sójových bobech. U této látky byl prozkoumán metabolismus střevními bakteriemi. Byl studován metabolismus daidzeinu ve fekálních vzorcích odebraných od šesti dobrovolníků. Dobrovolníci konzumovali sójové boby, které obsahují daidzein. Ve fekálních vzorcích bylo nalezeno několik metabolitů. Rozdíly v metabolitech byly jak mezi vzorky jedinců, tak i ve vzorcích odebraných v různých časech od jednoho

jedince. V jednom vzorku byl nalezen pouze dihydrodaidzein, v dalším vzorku našli dihydrodaidzein a equol. U dalšího vzorku pozorovali vznik equolu a *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA). Naopak u posledního vzorku byl při analýze zjištěn diadzein, což naznačuje, že nedošlo k žádné metabolické změně daidzeinu. Metabolity vzniklé v této práci jsou zobrazeny strukturními vzorci na Obrázku 3 [37].



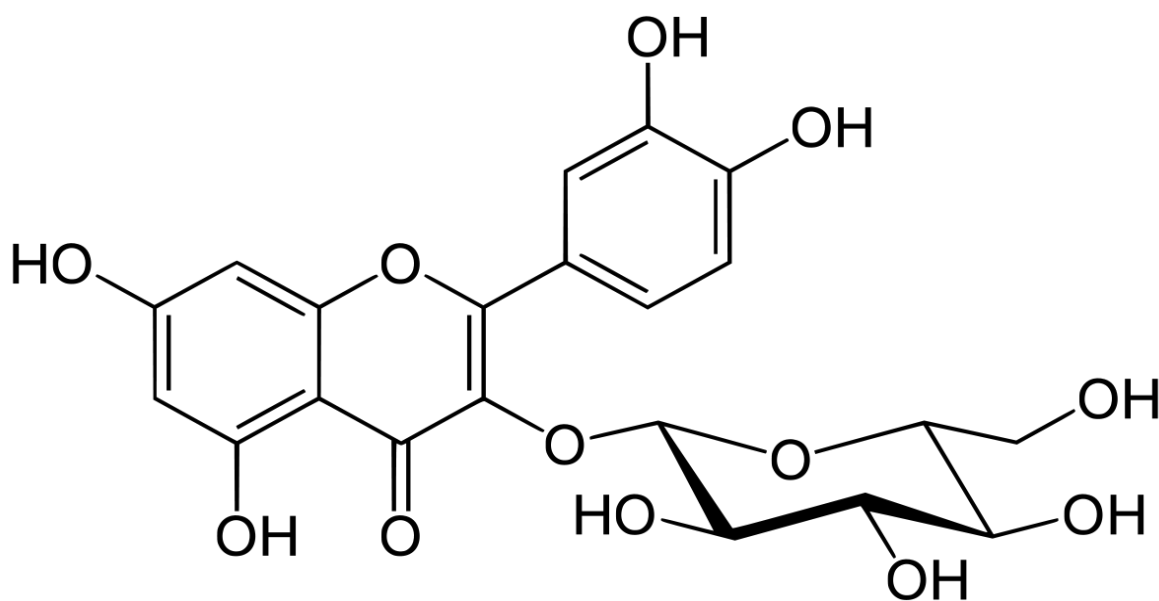
Obrázek 3: Strukturní vzorec daidzeinu, dihydrodaidzeinu, *O*-DMA, equol. Převzato z [37].

Dalším zástupcem flavonoidů, u kterého byl prozkoumán jeho metabolismus je quercetin (Obrázek 4, strana 11). Quercetin je látka obsažena v ovoci, zelenině a některých bylinách. U této látky byl dokázán metabolismus střevní mikroflórou. Bylo zjištěno, že k částečné degradaci quercetinu, za vzniku fenolických sloučenin, dochází po jejím orálním podání [38]–[40].



Obrázek 4: Strukturní vzorec quercetinu. Systematickým názvem je 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-3,5,7-trihydroxychromen-4-one. Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

Quercetin se nachází v rostlinné potravě ve formě glykosidů. Sacharid je vázán glykosidickou vazbou. Například isoquercetin (quercetin-3-*O*-β-D-glukosid; Q3G; Obrázek 5, strana 12) obsahuje sacharid navázaný *O*-glykosidickou vazbou v poloze 3 [41]. Quercetin je většinou degradován bakteriemi, které se nacházejí v lidském střevě, například bakterie *Bacteroides distasonis* nebo *Bacteroides uniformis*, které mohou hydrolyzovat látku quercitrin (na quercitrin je vázaná rhamnosa) na quercetin, který může být dále metabolizován jinými bakteriemi [42]. Mezi bakterie s větší kapacitou k degradaci quercetinu můžeme řadit i bakterie *Clostridium perfringens* a *Bacteroides fragilis* [43]. Látky vzniklé po degradaci quercetinu mohou procházet stěnou tlustého střeva a vstřebávat se do krve. Zejména v játrech dochází k další biotransformaci těchto látek [41].

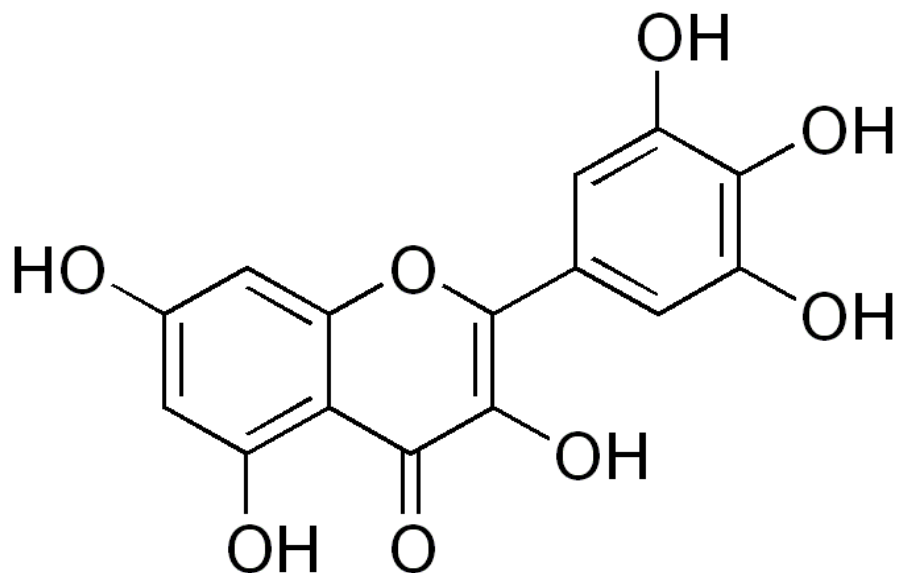


Obrázek 5: Strukturní vzorek isoquercetinu. Systematický název je 2-(3,4-dihydroxyfenyl)-5,7-dihydroxy-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxychromen-4-one. Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

2.5.3 Myricetin

Myricetin (MYR) je jedním z flavonoidů patřící do podtřídy flavonolů. Systematicky je pojmenován jako 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)-1-benzopyran-4-on (strukturní vzorec: Obrázek 6, str. 13) [44]. Jedná se o krystalickou látku, která je omezeně rozpustná ve vroucí vodě. Výskyt MYR v rostlinách je velmi vysoký, produkují ho především rostliny z čeledi Vřesnovitých (*Myricaceae*) [45], Ledvinovnickovitých (*Anacardiaceae*) [46], Rdesnovitých (*Polygonaceae*) [47] a Prvosenkovitých (*Primulaceae*) [48]. Vyskytuje se i v různých druzích ovoce a zeleniny, jako například v rajčatech, brokolici, borůvkách, černém rybízu, jablkách, zelených a bílých fazolích a je také součástí bylinných a zelených čajů [49]. MYR je látka s antioxidačními, pro-oxidačními a chelatačními vlastnostmi. Má také protikarcinogenní a protizánětlivé účinky [50]. Bylo prokázáno, že MYR napomáhá ochraně proti progresi Parkinsonovy nemoci a Alzheimerovy choroby, jelikož účinkuje proti specifickým bílkovinám, které jsou hojně zastoupeny v distálních částech axonů v nervových buňkách.

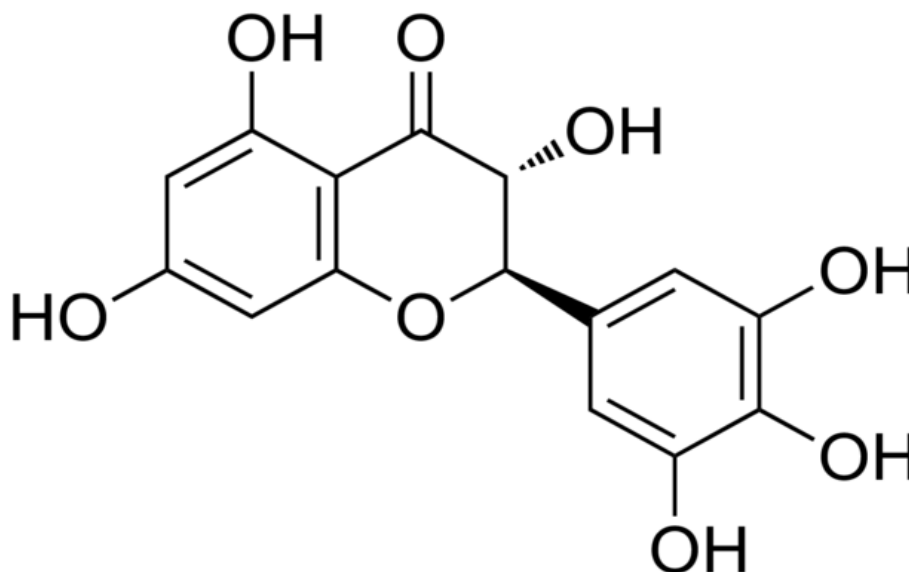
Také vykazuje antivirové a antibakteriální účinky, například proti gram-negativním anaerobním ústním patogenům *Porphyromonas gingivalis* a *Prevotella intermedia*. Účinkuje i proti řadě DNA polymeras, RNA polymeras, nebo má schopnost inhibovat reversní transkriptasu viru HIV [51], [52].



Obrázek 6: Strukturní vzorec myricetinu. Systematickým názvem je 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyfenyl)-1-benzopyran-4-on Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

2.5.4 Dihydromyricetin

Dihydromyricetin (DHM), také známý jako ampelopsin, sumárním vzorcem, patří do skupiny flavonoidů podtřídy flavonolů. Systematicky je nazván jako 2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-2,3,4,5-trihydroxyfenyl)-1-benzopyran-4-on (strukturní vzorec: Obrázek 7, str. 14). DHM je bílá krystalická látka, která má řadu farmakologických účinků, například protizánětlivý, kašel zmírňující, protinádorový, antimikrobiální, nebo antioxidační účinek [53], [54]. DHM je obsažen v rostlinách, například v révovníku *Ampelopsis grossedentata* podle kterého je označen jako ampelopsin. *Ampelopsis grossedentata* je rostlina rostoucí převážně v Číně. Z listů této rostliny je vařen Rattanový čaj s protizánětlivými, antibakteriálními, protinádorovými, antihypertenzními, nebo neuroprotektivními účinky. Usušené listy této rostliny obsahují DHM až z 20% hmotnosti sušiny – listy mají bělavou barvu. [55].



Obrázek 7: Strukturní vzorec dihydromyricetinu. Systematickým názvem je 2,3-dihydro-3,5,7-trihydroxy-2,3,4,5-trihydroxyfenyl)-1-benzopyran-4-on. Vytvořeno v programu ChemDraw Professional 16.0.

Další rostlina, ve které se nachází DHM, je Dužistopka sladká (*Hovenia dulcis*). Vyskytuje se ve východní Asii. V Japonsku, Číně, nebo Koreji má dlouhodobou historii jako doplněk stravy v tradiční medicíně. Extrakty z této rostliny urychlují detoxikaci ethanolu. V játrech potkanů a myši tyto extrakty zvyšují aktivitu enzymů alkoholdehydrogenas a acetaldehyddehydrogenas, tím dochází k rychlejšímu katabolismu ethanolu. Byly prokázány také jeho antioxidační vlastnosti [56].

V práci [57] zkoumali DHM, jako potenciální lék proti alkoholismu. Potkanům byl podán v různých dávkách ethanol a DHM. Bylo zjištěno, že dochází k interakci s GABA_A receptory v mozku. GABA_A receptory ovlivňují akutní i chronické působení ethanolu na mozek. DHM byl prokázán i jako induktor apoptózy a může také inhibovat růst buněk HepG2 v závislosti na čase a koncentraci [58].

V klinické studii [58] na dospělých pacientech, kteří trpí nealkoholickou steatózou, pozorovali účinek DHM na metabolismus glukosy, lipidů a mediátorů zánětu. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin. Jedna skupina dostávala dávky DHM a druhá skupina dostávala pouze placebo. U skupiny užívající DHM došlo k metabolismu glukosy a lipidů a k následnému zlepšení terapeutického účinku.

3 Cíl práce

Práce je zaměřena na studium vzájemné interakce flavonoidních sloučenin a střevní mikroflóry. Cílem práce bylo zjistit, zda je myricetin ve fekálních vzorcích (A, B, C) přeměňován na dihydromyricetin a zda tyto flavonoidní látky ovlivňují biodiverzitu bakterií ve fekálních vzorcích. Pro splnění těchto cílů je třeba řešit následující dílčí úlohy:

- za anaerobních podmínek sledovat časový průběh degradace MYR metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC)
- metodou PCR-DGGE sledovat vliv MYR a DHM na složení bakteriální mikroflóry ve fekálních vzorcích v průběhu tří dnů.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Použité chemikálie

APIChem (Čína)

dihydromyricetin

J.K.Baker (USA)

methanol

Lach-Ner (Česká republika)

ethylacetát, kyselina octová 99%

Linde (Česká republika)

dusík, oxid uhličitý, vodík

MACHEREY-NAGEL (Německo)

NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up

New England Biolabs (USA)

OneTaq[®] Quick-Load[®] Master Mix with Standard Buffer

OXOID (Anglie)

Brain Heart Infusion (BHI), AnaeroGen[™] 3.5L (sáček pro vytvoření anaerobního prostředí)

QIAGEN (Německo)

QIAamp PowerFecal DNA Kit

Serva (Německo)

močovina, persíran amonný

Sigma-Aldrich (USA)

akrylamid, dimethylsulfoxid, formamid, chlorzoxazon, PCR Grade Water, SYBR Green, KAPA2G Fast ReadyMix PCR Kit

Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Japonsko)

myricetin

VWR Chemicals

N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin

Experimentální vzorky

Dva vzorky lidských fekálií (B a C) byly odebrány od zdravých jedinců. Jeden vzorek (A) byl odebrán od nemocného jedince. Vzorky byly odebrány do nádoby obsahující AnaeroGen™ 3.5L pro vytvoření dočasného anaerobního prostředí.

4.1.2 Použité přístroje

Centrifugy

Mikrocentrifuga Prism™ C2500-R-230V, Labnet International, Inc. (USA), Spectrafuge Mini Centrifuge C1301B, Labnet International, Inc. (USA); BOECO SC-6 s výkyvným rotorem 6 × 15 ml, Boeckel (Německo)

Elektroforetická aparatura

DCode™ System, Bio-Rad (USA)

HPLC systém

Agilent technologies 1200 (USA) - čtyřkanálová peristaltická pumpa 1200, 1200 automatický dávkovač ALS G1329A, 1200 vakuový degasser G1322A, kolonový termostat LCO102, ECOM s.r.o. (Česká republika)

HPLC kolona

Chromolith RP-18 E, Merck (Německo)

Homogenizátor

FastPrep®-24 Classic Instrument, MP Biomedicals (USA)

Injekční mikrostříkačka

MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton, max. objem 25 µl (Švýcarsko)

NanoDrop

Thermo Scientific™ NanoDrop™ (USA)

PCR cyclery

Biometra TAdvanced 96 SG, 240 V (Německo), Biometra TProfessional 96 (Německo)

Peristaltické čerpadlo a dávkovač

PCD 21, Kouřil (Česká republika)

Předvážky

KERN EW 600-2M, Kern & Sohn GmbH, (Německo)

Vakuová pumpa

Laboport, KNF Lab (USA)

Vakuové centrifugační zahušťovací zařízení

Acid-Resistant CentriVap Concentrator, Labconco (USA)

Vodní lázeň

Julabo TW12 (Německo)

Vortexy

Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc. (USA), MS2 minishaker, IKA (USA), Vortex Mixer VX-200, Labnet (USA),

Zobrazovací zařízení pro dokumentaci gelu

Molecular Imager® Gel Doc™ XR+, Bio-Rad (USA)

Zdroj pro elektroforézu

PowerPac Basic, Bio-Rad (USA)

4.2 Metody

4.2.1 Anaerobní kultivace flavonoidů s fekálními bakteriemi

Příprava McDougallova pufru (McD.) proběhla podle návodu [59], BHI médium bylo připraveno podle návodu od výrobce OXOID a diluční roztok podle návodu [60]. Příprava pufrů probíhala za anaerobních podmínek. Připravené BHI medium bylo po 10 ml za anaerobních podmínek rozděleno do 70 kultivačních zkumavek typu Hungate (dále jen kultivační zkumavky). Zároveň byl po 10 ml rozdělen McD. pufr za anaerobních podmínek do 70 kultivačních zkumavek. Diluční roztok byl rozdělen po 35 ml do 10 skleněných lahviček. Fekální vzorky s MYR byly připraveny pro extrakci MYR (kapitola 4.2.1.1) a pro zjištění diverzity fekálních bakterií. Postup odebrání mikrozkušavek pro zjištění vlivu MYR na diverzitu populací fekálních bakterií je stejné, jako odebrání mikrozkušavek u přípravy fekálních vzorků s DHM (kapitola 4.2.1.2)

4.2.1.1 Příprava fekálních vzorků s MYR pro extrakci MYR

Do 35 ml dilučního roztoku bylo za současného zavádění plynu (složení plynu 75 % N₂, 25 % CO₂, 5 % H₂) přidáno 35 g stolice vzorku A. Stejně byly připraveny i vzorky B a C. Po vytvoření anaerobního prostředí byly vzorky promíchány na Vortexu. Pro přípravu vzorků bez MYR (negativní kontrola, MN) bylo anaerobně odebráno injekční stříkačkou po 1,5 ml připravené suspenze a aplikováno přes septum do 2 kultivačních zkumavek s McD. puforem a do 2 kultivačních zkumavek s BHI médiem. Jedna zkumavka od každého média byla zamrazena a uchována při -20 °C (čas inkubace $t = 0$). Druhá kultivační zkumavka byla vložena do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120) s nastavenou teplotou inkubace 37 °C (postup zpracování v kapitole 4.2.1.2).

Od každého fekálního vzorku (A, B a C) zbylo 64 g inokula (fekální vzorek A, B nebo C v McD. pufru/BHI médiu). Do tohoto inokula bylo přidáno za současného zavádění plynu 5,6 mg MYR (celková koncentrace 240 nmol/g) a vše bylo promícháno na Vortexu. Takto připravené inokulum bylo po 1,5 ml zaočkováno injekční stříkačkou do kultivačních zkumavek s McD. puforem a BHI médiem. Poté jedna kultivační zkumavka s MYR od každého typu kultivace a každého fekálního vzorku byla zamrazena pro čas inkubace $t = 0$ a druhá kultivační zkumavka byla zpracována viz. kapitola 4.2.1.2.

Připravené kultivační zkumavky s MYR byly vloženy do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120) s nastavenou teplotou inkubace 37 °C. Po 3 a 6 hodinách inkubace byly odebrány vždy tři kultivační zkumavky od každého typu kultivace a každého fekálního vzorku. Kultivační zkumavky byly uchovány při -20 °C.

4.2.1.2 Příprava vzorků s DHM na diverzitu

Do 35 ml dilučního roztoku bylo přeneseno 1,75 g stolice vzorku A. Následně bylo do 35 ml dilučního roztoku naváženo 1,75 g stolice vzorku B a stejně byl připraven i vzorek C. Příprava inokula probíhala za současného zavádění plynu (složení plynu 75 % N₂, 25 % CO₂, 5 % H₂). Po vytvoření anaerobního prostředí byly vzorky promíchány na Vortexu. Pro přípravu vzorků bez DHM (negativní kontrola, DMN) bylo anaerobně do 2 kultivačních zkumavek s McD. pufrem a BHI médiem (10 ml) přeneseno injekční stříkačkou 1,5 ml připraveného inokula bez DHM. Z takto připravených kultivačních zkumavek bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkušavek (vždy jedna od typu kultivace a fekálního vzorku) a byly zamrazeny pro čas inkubace $t = 0$. Do 32 g zbylého inokula od každého fekálního vzorku bylo za současného zavádění plynu přidáno 2,4 mg DHM (celková koncentrace 240 nmol/g) a vše bylo promícháno na Vortexu. Takto připravená inokula od každého vzorku stolice byla zaočkována po 1,5 ml do kultivačních zkumavek s McD. pufrem (10 ml) a BHI médiem (10 ml). Z takto připravených kultivačních zkumavek bylo odebráno 1,5 ml do mikrozkušavky. Mikrozkušavky se vzorky byly zamrazeny pro čas inkubace $t = 0$. Kultivační zkumavky s DHM/MYR (DMY/MY) a zkumavky bez DHM/MYR (DMN/MN) byly vloženy do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha) s nastavenou teplotou inkubace 36 °C. Po 3, 6, 24 a 72 hodinách inkubace bylo odebráno z každé kultivační zkumavky, od každého fekálního vzorku a média, po 1,5 ml do mikrozkušavek. Jednotlivé mikrozkušavky byly uchovány při -20 °C.

4.2.2 Extrakce myricetinu

Pro extrakci MYR byly rozmrazeny kultivační zkumavky se vzorkem. S McD. pufrem a BHI médiem byla od každého vzorku A, B a C rozmrazena vždy jedna kultivační zkumavka bez přidání MYR, jedna s přidáním MYR pro čas inkubace $t = 0$ a tři kultivační zkumavky pro čas inkubace 3 a 6 hodin.

Z rozmrazených kultivačních zkumavek byly odebrány 2 ml inkubační směsi do vysoké zkumavky. Kultivační zkumavky se zbylou inkubační směsí byly hned po odebrání směsi zamrazeny pro další použití. Pro potřebnou úpravu pH bylo ke 2 ml inkubační směsi přidáno 10 μ l 99% kyseliny octové a promícháno na Vortexu. Jako vnitřní standard byl do směsi přidán chlorzoxazon (30 μ l 1mM roztoku) a vše znovu promícháno na Vortexu. Poté bylo přidáno 6 ml ethylacetátu a 80 s extrahováno pomocí Vortexu. Po extrakci byla směs přenesena do centrifugačních zkumavek, které byly opatřeny uzávěrem. Následnou centrifugací 10 minut při 4000 RPM a 10 °C na centrifuze BOECO SC-6 s výkyvným rotorem (6 \times 15 ml) byla separována ethylacetátová frakce (4 ml) a po částech odpařena při 36 °C na vakuovém centrifugačním zahušťovacím zařízení CentriVap (Labconco) přibližně 200 minut. Odparky byly rozpuštěny v methanolu o objemu 50 μ l a před aplikací do RP-HPLC byly centrifugovány 30 s (minicentrifuga SpectrafugeTM, úhlový rotor 6 \times 2,0 ml, 6000 RPM).

4.2.3 HPLC na reverzní fázi

Vzorky s extrahovaným MYR (25 μ l) byly přeneseny do vialky tvaru „Champagne“. Zbytek byl zamrazen pro další analýzu. Takto připravené vzorky byly analyzovány metodou RP-HPLC s UV-detekcí (HPLC Agilent 1200 series) na monolitické koloně Chromolith RP-18 E. HPLC systém byl sestaven z čtyřkanálové peristaltické pumpy, automatického dávkovače (ALS G1329A), vakuového degasseru (G1322A) a termostatu kolon (LCO102, ECOM s.r.o.).

Z bakalářské práce [61] bylo převzato složení mobilní fáze. Mobilní fáze A obsahovala 40% methanol s 0,1% trifluorovou kyselinou (TFA), mobilní fáze B 100% methanol a fáze C obsahovala ultračistou vodu s 0,1% TFA. Takto připravené mobilní fáze byly před použitím vakuově přefiltrovány systémem Stericup[®].

V Tabulce 1 (strana 23) jsou uvedeny podmínky a složení gradientu použitého pro analýzu extraktů inkubací s MYR.

Tabulka 1 – Podmínky a složení gradientu pro RP-HPLC.

t [min]	A [%]	B [%]	C [%]
0 – 5,5	40	0	60
6,5 – 15,5	80	0	20
16,0 – 17,5	50	50	0
18,0 – 20,0	40	0	60

Po celou dobu měření byl průtok mobilní fáze nastaven na 1,5 ml/min. Tlak pro analýzu byl nastaven přibližně na 40 barů a detekce probíhala při 340 nm a 280 nm. Analýza trvala 20 minut. Použitá kolona byla termostatovaná přibližně na 36 °C. Objem vzorku jedné analýzy byl 20 µl. Po proběhnutí analýzy byly vzorky vyhodnoceny metodou vnitřního standardu a výsledky byly statisticky zpracovány v programu Microsoft Excel 2007.

4.2.4 Izolace bakteriální DNA

Izolace bakteriální DNA z fekálních vzorků byla prováděna pomocí soupravy „QIAamp PowerFecal DNA Kit“ od výrobce QIAGEN. Vzorky v mikrozkušavkách (1,5 ml) byly rozmrazeny a centrifugovány 1 minutu při 6000 RPM na centrifuze PrismrTM. Supernatant byl odstraněn a peleta byla resuspendována v 750 µl „PowerBead Solution“ roztoku. Celý objem byl přenesen do zkumavky typu „Dry Bead Tube“ a bylo přidáno 60 µl roztoku „Solution C1“. Zkumavky byly vloženy homogenizátoru FastPrep[®]-24 a třepány 60 s při max. nastavených otáčkách. Následně byly vzorky vloženy na 10 min. do vodní lázně vyhřáté na 70 °C. Homogenizace a zahřátí bylo provedeno dvakrát. Po zahřátí byly zkumavky centrifugovány 1 min. při 13 000 × g na centrifuze PrismrTM. Následně bylo přeneseno 500 µl supernatantu do zkumavky typu „Collection Tube“, bylo přidáno 250 µl roztoku „Solution C2“, promícháno na Vortexu a vloženo na 5 minut do chladicího boxu o teplotě 2 °C. Poté byl celý obsah centrifugován 1 min. při 13 000 × g.

Vzniklý supernatant (600 µl) byl přenesen do nové mikrozkušavky „Collection Tube“, bylo přidáno 200 µl roztoku „Solution C4“, promícháno na Vortexu a vloženo na 5 min. do chladicího boxu o teplotě 2 °C a následně centrifugováno 1 min. při $13\,000 \times g$. Poté bylo přeneseno 750 µl supernatantu do mikrozkušavky „Collection tube“, přidáno 1200 µl roztoku „Solution C4“ a promícháno 5 s na Vortexu. Do kolony „MB Spin Column“ bylo po částech přenášeno 650 µl supernatantu a celá kolona byla centrifugována 1 min. při $13\,000 \times g$. Po centrifugaci veškerého objemu supernatantu bylo do kolony „MB Spin Column“ přidáno 500 µl roztoku „Solution C5“ pro promytí DNA a centrifugováno 1 minutu při $13\,000 \times g$. Pro zbavení se veškerého roztoku „Solution C5“ byla provedena centrifugace 2 min. při $13\,000 \times g$. Kolona „MB Spin Column“ byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a bylo přidáno 100 µl roztoku „Solution C6“ přímo na matrix v koloně. Centrifugací 1 min. při $10\,000 \times g$ byla vymyta DNA z kolony. Následně byla změřena koncentrace izolované DNA na NanoDrop One^C. Mikrozkušavky s DNA byly uchovány při -20 °C.

4.2.5 PCR-DGGE metoda

Podle metodiky [12] byly analyzovány vzorky na přítomné bakterie metodou PCR-DGGE.

- **„Nested“ PCR – vzorky s MYR**

PCR metodu řadíme mezi metody kvalitativní analýzy. Tato metoda byla vyvinuta v roce 1983. Vyvinul ji Kary Mullis, který za tento objev dostal v roce 1993 Nobelovu cenu v kategorii chemie. PCR je založena na amplifikaci úseku DNA, který je vymezen primery (krátké oligonukleové řetězce). Při ampifikaci dochází k replikaci a vzniká mnoho kopií potřebného úseku DNA. Od objevení metody PCR došlo k jejím úpravám a vzniku různých typů této metody, jako například asymetrická PCR, „hot start“ PCR, kvantitativní PCR, „nested“ PCR a mnoho dalších [65].

Pro analýzu vzorků bylo potřeba amplifikovat úsek DNA, kódující 16S rRNA přítomných bakterií. Vzorky z inkubací s MYR byly připraveny tzv. „nested“ PCR, při které se zvyšuje specifita amplifikovaného úseku DNA snížením pozadí díky nespecifické amplifikaci DNA. Při „nested“ PCR metodě se používají dvě sady primerů ve dvou po sobě jdoucích PCR. První sada primerů produkuje DNA, která mimo cíleného úseku může obsahovat nespecificky amplifikované fragmenty DNA. Tento vzniklý produkt se použije

ve druhé PCR, při které se přidává druhá sada primerů, která je odlišná od první sady. Této metody se využívá při amplifikaci dlouhých DNA fragmentů.

Izolovaná bakteriální DNA (viz. kapitola 4.2.4) byla podle změřené koncentrace naředěna do mikrotitrační destičky. Ředění DNA bylo buď 2×, 3× nebo 5×. Do mikrotitrační destičky bylo odměřeno 20 µl, 40 µl, nebo 80 µl PCR H₂O a k tomuto množství bylo přidáno 20 µl DNA a promícháno. Do 2 ml mikrozkušavky byla připravena reakční směs pro PCR reakci. Takto připravená reakční směs byla odměřena po 29 µl do mikrotitrační destičky a byl k ní přidán 1 µl naředěné DNA. Složky reakční směsi pro jeden vzorek DNA jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Složky reakční směsi pro jeden vzorek DNA – 1. PCR reakce.

Složka reakční směsi	V [µl]
Izolát DNA	1
„Forward“ primer 616	0,5
„Revers“ primer 630	0,5
PCR „mix“	15
PCR H ₂ O	13

Legenda: PCR „mix“ obsahující Tris-HCl, KCl, MgCl₂, NH₄Cl, agar, dNTP „mix“ (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), stabilizátory a *OneTaq* DNA polymerasa, „Forward“ primer 616 (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') a „Reverse“ primer 630 (5'-CAKAAAGGAGGTGATCC-3') byl 10× naředěn vodou ze zásobního 100µM roztoku. PCR H₂O a PCR mix jsou od výrobce Sigma-Aldrich.

Takto připravené vzorky na mikrotitrační destičce byly uzavřeny fólií a vloženy do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometra). PCR metoda závisí na několika na sebe navazujících krocích, které jsou charakterizovány určitou teplotou a časem. První PCR při „nested“ PCR je složena z kroků, které jsou uvedeny v Tabulce 3 na straně 26.

Tabulka 3: Teplotní a časové podmínky jednotlivých kroků 1. PCR metody.

Krok	t	T [°C]
1	5 min	95,0
2	30 s	95,0
3	30 s	52,0
4	1 min	72,0
5	5 min	72,0
6	10 min	8,0

Krok 2 - 4 byl 32 × opakován. Při 95 °C dochází k denaturaci DNA. Při snížení teploty na 52 °C dojde k nasednutí primeru na vzniklou jednovláknovou DNA. Při 72 °C dojde k elongaci nových řetězců. Kroky 2 - 4 se opakují pro amplifikaci daného úseku DNA. Po namnožení DNA dochází k ochlazení na teplotu 8 °C.

Pro kontrolu a vizualizaci PCR produktů 1. PCR reakce byla provedena nativní elektroforézou. Byl připraven 1,5% agarosový gel s ethydiem bromidem (5 µl). Do první dráhy byly vždy nanесeny 2 µl standardu DNA a do dalších drah byly nanášeny 2 µl PCR produktů. Elektroforéza probíhala 20 minut při 110 V. Po kontrole byla provedena purifikace DNA, její postup je uveden v kap. 4.2.6. S takto připravenou a purifikovanou DNA byla provedena 2. PCR reakce. Složení reakční směsi v 2 ml mikrozkuhavce pro jeden vzorek DNA je uvedeno v Tabulce 4 (str. 27). Po přípravě 2. PCR reakce byla mikrotitrační destička se zbylou purifikovanou DNA uchována při -20 °C pro další použití.

Tabulka 4: Složky reakční směsi pro jeden vzorek DNA – 2. PCR reakce.

Složka reakční směsi	V [μl]
Izolát DNA	1,0
„Forward“ primer 338GC	0,5
„Revers“ primer 534RP	0,5
PCR „mix“	15
PCR H ₂ O	13

Legenda: PCR mix obsahující Tris-HCl, KCl, MgCl₂, agar, dNTP „mix“ (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), stabilizátory a KAPA DNA polymerasa, „Forward“ primer 338GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGCCCGCCCGCCGCGCACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') a „Reverse“ primer 534RP (5'-ATT ACCGCGGCTGCTGG- 3') byl 10× naředěn sterilní vodou ze zásobního 100μM roztoku. PCR H₂O a PCR „mix“ jsou od výrobce Sigma-Aldrich.

Reakční směs byla odměřena po 29 μl do mikrotitrační destičky a byl k ní přidán 1 μl purifikované DNA po 1. PCR reakci. Takto připravené vzorky na mikrotitrační destičce byly uzavřeny fólií a vloženy do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria). Jednotlivé kroky druhé PCR jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Teplotní a časové podmínky jednotlivých kroků 2. PCR reakce.

Krok	t	T [°C]
1	5 min	95,0
2	30 s	95,0
3	20 s	61,0
4	40 s	72,0
5	5 min	72,0
6	30 min	8,00

Krok 2 - 4 byl 34 × opakován. Při 95 °C dochází k denaturaci DNA. Při snížení teploty na 61 °C dojde k nasednutí primeru na vzniklou jednovláknovou DNA. Při 72 °C dojde k elongaci nových řetězců. Kroky 2 - 4 se opakují pro amplifikaci daného úseku DNA. Po namnožení DNA dochází k ochlazení na teplotu 8 °C.

Po dokončení jednotlivých kroků 2. PCR reakce byla provedena kontrola PCR produktů pomocí nativní elektroforézy na 1,5% agarosovém gelu s ethyidium bromidem o objemu 5 μ l. Elektroforéza probíhala 20 minut při laboratorní teplotě a 110 V.

- **PCR – vzorky s dihydromyricetinem**

Izolovaná bakteriální DNA byla naředěna 2 \times do mikrotitrační destičky (20 μ l DNA a 20 μ l PCR H₂O). Do 2 ml mikrozkuřavky byla připravena reakční směs pro PCR reakci. Vše bylo promícháno na Vortexu. Složky reakční směsi pro jeden vzorek DNA jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 6: Složky reakční směsi pro jeden vzorek DNA

Složka reakční směsi	V [μ l]
Izolát DNA	1,0
„Forward“ primer 338GC	1,0
„Revers“ primer 534RP	1,0
PCR „mix“	15
PCR H ₂ O	13

Legenda: PCR mix obsahující Tris-HCl, KCl, MgCl₂, agar, dNTP „mix“ (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), stabilizátory a KAPA DNA polymerasu, „Forward“ primer 338GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCC GGCCCGCCGCGCCGCGCCGCACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') a „Reverse“ primer 534RP (5'-ATT ACCGCGGCTGCTGG- 3') byl 10 \times naředěn sterilní vodou ze zásobního 100 μ M roztoku. PCR H₂O a PCR „mix“ jsou od výrobce Sigma-Aldrich.

Reakční směs byla odměřena po 29 μ l do mikrotitrační destičky a byl k ní přidán 1 μ l naředěné DNA. Takto připravené vzorky na mikrotitrační destičce byly uzavřeny fólií a vloženy do PCR „cycleru“ TAdvanced 96 SG (Biometria). Jednotlivé kroky PCR reakce jsou uvedeny na předchozí stránce v Tabulce 5.

Po dokončení jednotlivých kroků PCR reakce byla provedena kontrola PCR produktů pomocí nativní elektroforézy na 1,5% agarosovém gelu s ethyidium bromidem o objemu 5 μ l. Elektroforéza probíhala 20 minut při laboratorní teplotě a 110 V.

4.2.5.1 DGGE

Při denaturační gradientové gelové elektroforéze dochází k separaci oligonukleotidových řetězců. Separace je založena na elektroforetické pohyblivosti úseku dsDNA v polyakrylamidovém gelu. Elektrické pole určuje rychlost putování amplifikované DNA. Pohyblivost v gelu odpovídá molekulové hmotnosti dsDNA. Kvůli zvyšující se koncentraci denaturačních látek v gelu (močovina, formamid) dochází k oddělení a denaturaci DNA [12]. Metoda DGGE má i své nevýhody. Jednou z nevýhod je, že některé fylogeneticky nesourodé sekvence se chovají obdobně a zaujmají v gelu stejnou pozici [62]. Další nevýhodou je citlivost detektoru. Nemusí být zachyceny některé bakteriální druhy, které se nacházejí v mikrobiální směsi ve velmi nízkém množství [63].

Nejprve byl připraven gel s „denaturační silou“, která se mění v závislosti na koncentraci formamidu a močoviny v jednotlivých roztocích. „Denaturační síla“ gelu se pohybuje v rozmezí 35 % - 60 %. V Tabulce 7 jsou uvedeny jednotlivé složky pro přípravu roztoků pro jeden gel.

Tabulka 7: Složky pro jeden denaturační polyakrylamidový gel.

Roztok	35 % roztok	60 % roztok
40% akrylamid [ml]	5,560	5,560
50× TAE [ml]	0,500	0,500
Formamid [ml]	3,500	6,000
H ₂ O [ml]	3,675	6,300
Močovina [g]	12,250	9,500

Po přípravě roztoků byla připravena DGGE aparatura se silou „spaceru“ 1,5 mm. Do systému spojených nádob byly nality připravené polymerační roztoky, do nádoby blíže k výpusti byl nalit roztok se silnější denaturační silou (60 %) a do vzdálenější nádoby roztok se slabší denaturační silou (35 %). Spojnice mezi nádobami byla uzavřena. Jehla výpustě byla umístěna mezi skla aparatury DGGE. Za stálého míchání bylo do každé nádoby přidáno 200 µl 10% APS (peroxodisíran amonný) a 20 µl TEMEDu pro zahájení polymerace. Po přidání APS a TEMEDu byly nádoby spojeny a bylo zapnuto čerpadlo. Po naplnění aparatury DGGE polymeračními roztoky byl vložen „hřeben“ pro vytvoření 25 jamek pro aplikaci vzorků. Gel polymeroval přibližně 45 minut.

Během polymerace gelu byl připraven 1× naředěný tris-acetátový pufr (TAE; složení: 40mM Tris, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA) o objemu 7 l naředěním zásobního roztoku. Pufr byl nalit do elektroforetické vany a byl vyhříván na 60 °C. Po polymeraci gelu byl vyndán „hřeben“ a skla s bočnicemi byla nasazena do vnitřní části DGGE aparatury. Poté byla celá vnitřní část DGGE aparatury umístěna do elektroforetické vany. Vzniklé jamky v gelu byly promyty injekční stříkačkou s jehlou 1× TAE pufrem a následně bylo do těchto jamek pipetováno po 30 µl od každého vzorku. Elektroforéza probíhala 10 minut při 30 V. Po ustanovení teploty na 60 °C bylo napětí zvýšeno na 55 V. Za těchto podmínek elektroforéza probíhala 18 hodin.

Gel byl vyjmut z aparatury a barven v 50 ml 1× TAE pufru s přídavkem 5 µl interkalační barvy SYBR Green (0,001 %) 30 minut za stálého míchání. Po obarvení byl gel fotograficky zdokumentován kamerou „Molecular Imager® Gel Doc™ XR+“ od výrobce Bio-Rad.

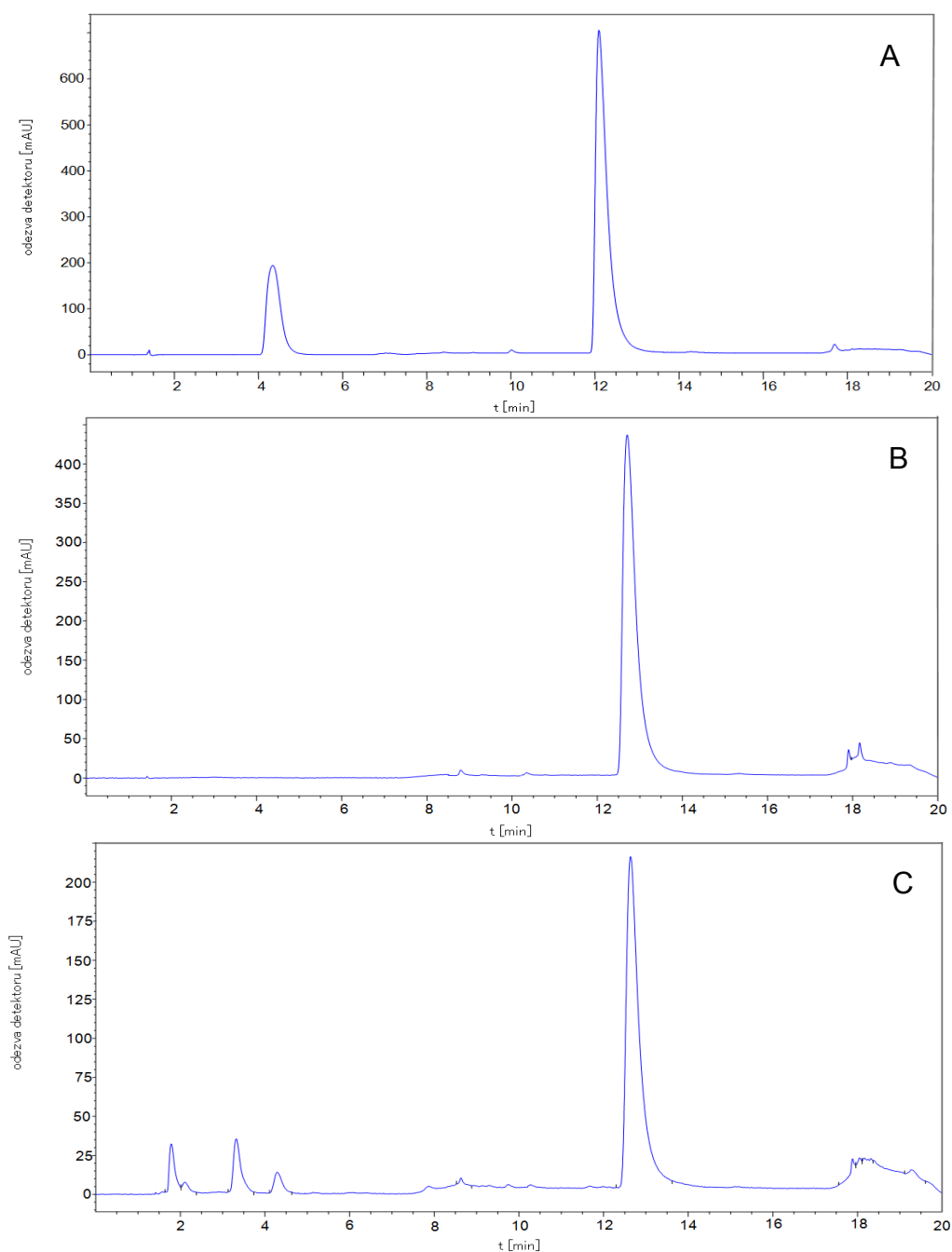
4.2.6 Purifikace bakteriální DNA

Purifikace bakteriální DNA z fekálních vzorků mezi první a druhou PCR reakcí u „nested“ PCR byla prováděná pomocí soupravy „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ od výrobce MACHEREY-NAGEL. Vzorky v mikrotitrační destičce (30 µl) po PCR reakci byly naředěny 60 µl pufru „Buffer NT1“. Takto naředěné vzorky byly přeneseny do kolony „NucleoSpin® Gel and Clean-up Column“ a centrifugovány 1 min. při 11 000 × g na centrifuze Prismr™. Následně na kolonu bylo nanášeno 700 µl pufru „Buffer NT3“ a centrifugováno 1 min. při 11 000 × g. Pufr „Buffer NT3“ byl odstraněn další centrifugací 1 min. při 11 000 × g. Kolona „NucleoSpin® Gel and Clean-up Column“ byla přenesena do čisté 1,5 ml mikrozkušavky a matrix v koloně byl převrstven 30 µl pufru „Buffer NE“ a centrifugováno 1 min. 11 000 × g čímž došlo k vymytí DNA z kolony. Následně byla změřena koncentrace izolované DNA na NanoDropu™. Z mikrozkušavek byla DNA přenesena do mikrotitrační destičky a uchována při 5 °C.

5 Výsledky

5.1 Degradace MYR bakteriemi střevní mikroflóry

U vzorků stolice (A, B a C) byla v průběhu 0, 3 a 6 hodin sledována degradace myricetinu s fekálními bakteriemi v McD. pufru a BHI médiu. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí RP-HPLC. Na Obrázku 8 (str. 32) jsou znázorněny reprezentativní chromatogramy, které odpovídají všem analyzovaným vzorkům. Chromatogram A je pro standardní vzorek, který obsahoval MYR, DHM a chlorzoxazon. Chromatogram B je pro McD. pufr, který obsahoval MYR a chromatogram C je pro BHI médium, které obsahovalo MYR.



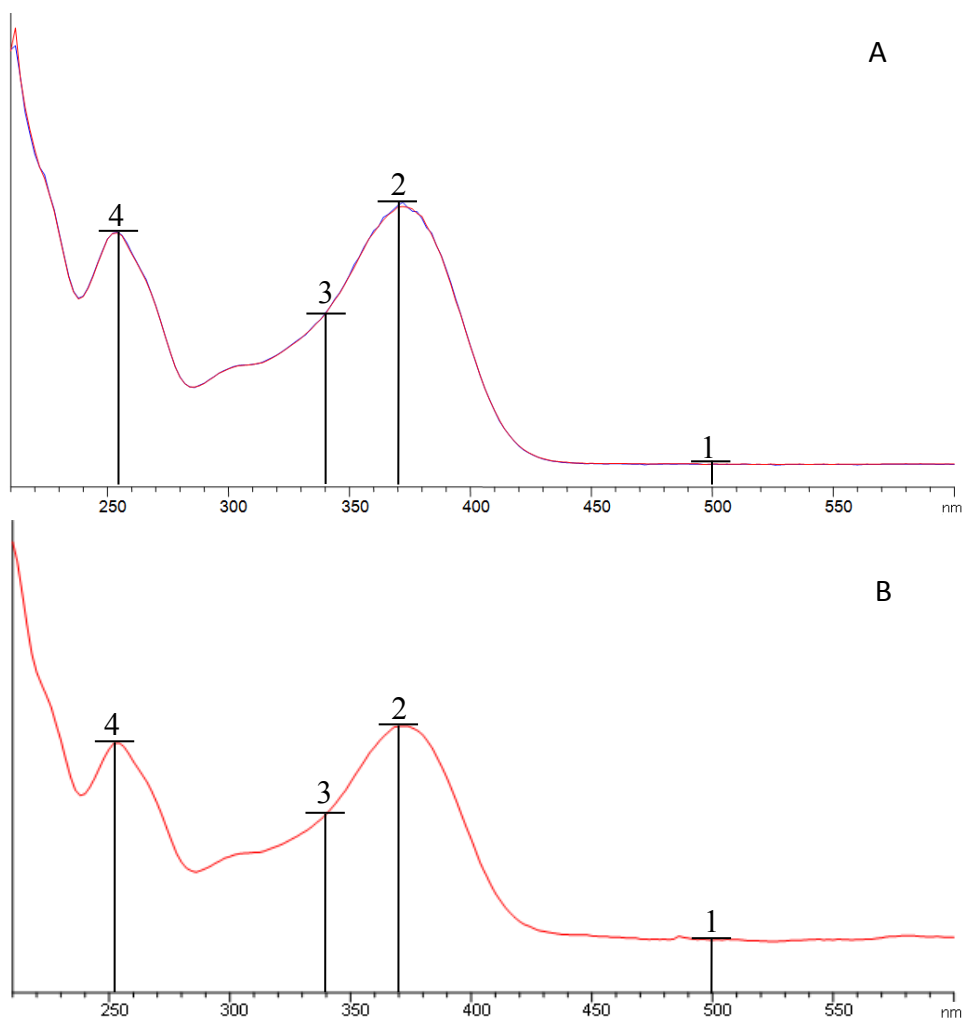
Obrázek 8: Reprezentativní chromatogramy. Chromatogram A je pro standardní vzorek (2 μ l 10mM DHM, 2 μ l 10mM MYR, 10 μ l 1mM chlorzaxozonu a 11 μ l methanolu). Chromatogram B je pro McD. pufr, ve kterém byl přítomen MYR (čas 0 hodin) a chromatogram C je pro BHI médium (čas 0 hodin), ve kterém byl MYR. Vzorek byl analyzován na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, gradientová eluce, složení mobilní fáze A: 40 % methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100 % methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA) Analýza probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

Na Obrázku 9 (str. 34) je porovnání reprezentativních spekter „píku“ MYR (A) ve standardním vzorku a spektrum „píku“ MYR (B) v inkubační směsi s fekálními bakteriemi vzorku A v McD. pufru za anaerobních podmínek v čase inkubace $t = 0$. Spektra uvedená na Obrázku 9 jsou reprezentativní a odpovídají spektrům všech vzorků, podle kterých byl určován MYR. V Tabulce 8 jsou uvedeny poměry „bodů“, vyznačených ve spektrech.

Tabulka 8: Poměry absorbancí odečtených ze spektr.

Spektrum	A - standard	B – reakční směs
Vlnové délky měrných bodů [nm]	Poměr absorbancí	
370 / 254	1,1	1,1
370 / 340	1,7	1,7

Legenda: Od všech absorbancí v měrných bodech spektra byla odečtena hodnota „základní linie“ při 500 nm (bod 1).



Obrázek 9: Porovnání spekter MYR při RP-HPLC. Spektrum A je MYR ve standardním vzorku. Spektrum B je MYR ve fekálním vzorku A inkubovaném v McD. pufru a čase inkubace $t = 0$. Ve spektrech jsou vyznačené body, ze kterých byly vytvořeny poměry pro přesné porovnání spekter. Vzorek byl analyzován na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, gradientová eluce, složení mobilní fáze A: 40 % methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100 % methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA) Analýza probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

- **Vzorek A**

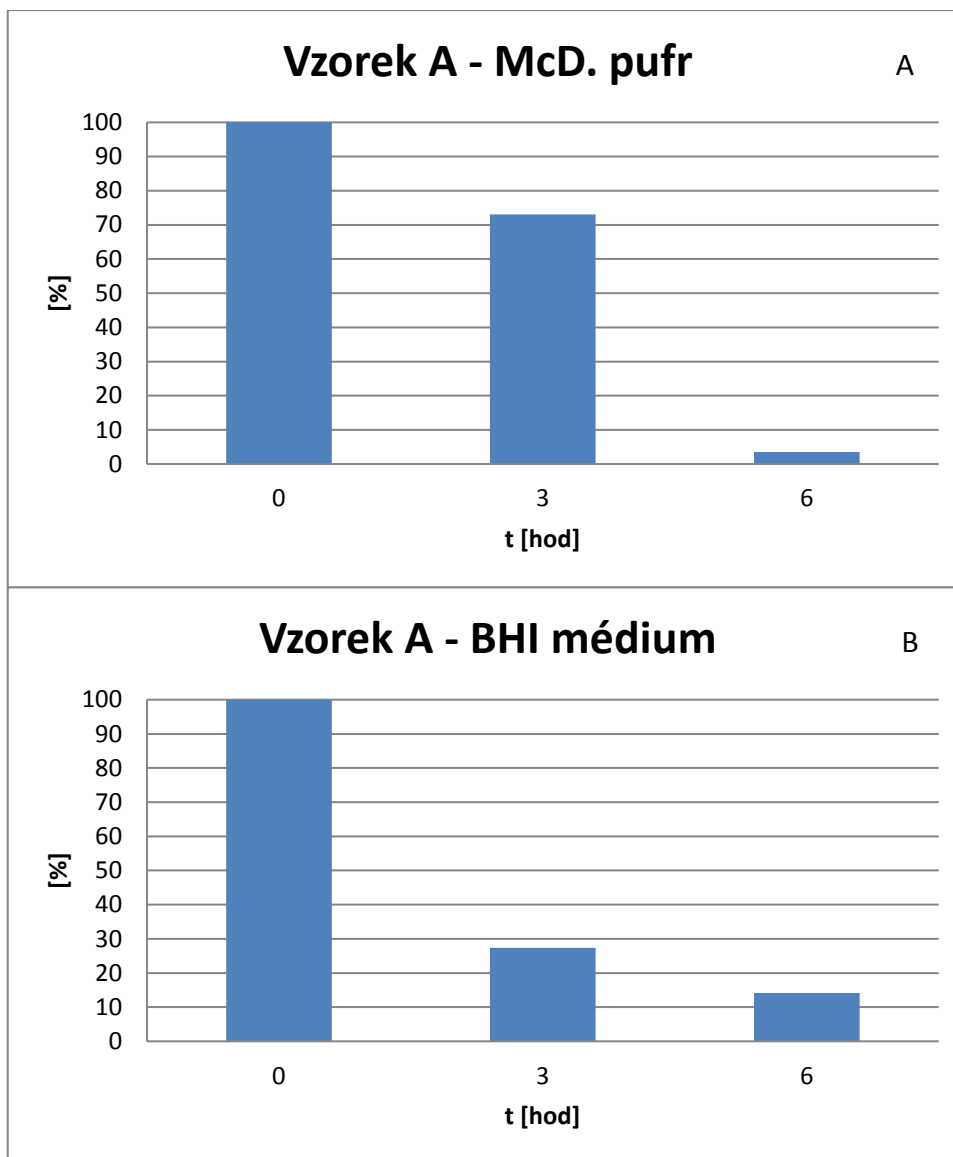
Pomocí RP-HPLC byly analyzovány inkubační směsi v McD. pufru a BHI médiu lidských fekálních bakterií s MYR kultivované za anaerobních podmínek. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 9. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu.

Tabulka 9: Naměřené hodnoty časové degradace MYR ve McD. pufru a BHI médiu se vzorkem A.

Čas [hod]	0	3	6
McD. pufr	215,0	104,8	4,628
	261,1	98,70	5,250
BHI médium	373,3	92,71	47,61
	305,9	93,67	48,71

Legenda: Uvedené hodnoty jsou AUC pro MYR vyjádřené relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu. Hodnoty jsou vynásobeny 100×. Od McD. pufru a BHI média byl pro čas inkubace 0, 3 a 6 hodiny, vzorek analyzován dvakrát metodou RP-HPLC.

Pro přehlednost výsledků byly naměřené hodnoty pro McD. pufr a BHI médium v Tabulce 9 zprůměrovány a vztaženy k 100% pro čas inkubace $t = 0$. Tyto hodnoty jsou uvedeny na Obrázku 10 na straně 36.



Obrázek 10: Časová závislost degradace MYR. Inkubace MYR se vzorkem fekálních bakterií od dárce A probíhala 0, 3 a 6 hodin v McD. pufru (A) a BHI médiu (B) za anaerobních podmínek. Po extrakci ethylacetátem byl analyzován metodou RP-HPLC. Množství MYR je vztaženo k 100% pro čas inkubace $t = 0$. Analýza proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, gradientová eluce, složení mobilní fáze A: 40 % methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100 % methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA) Analýza probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

- **Vzorek B**

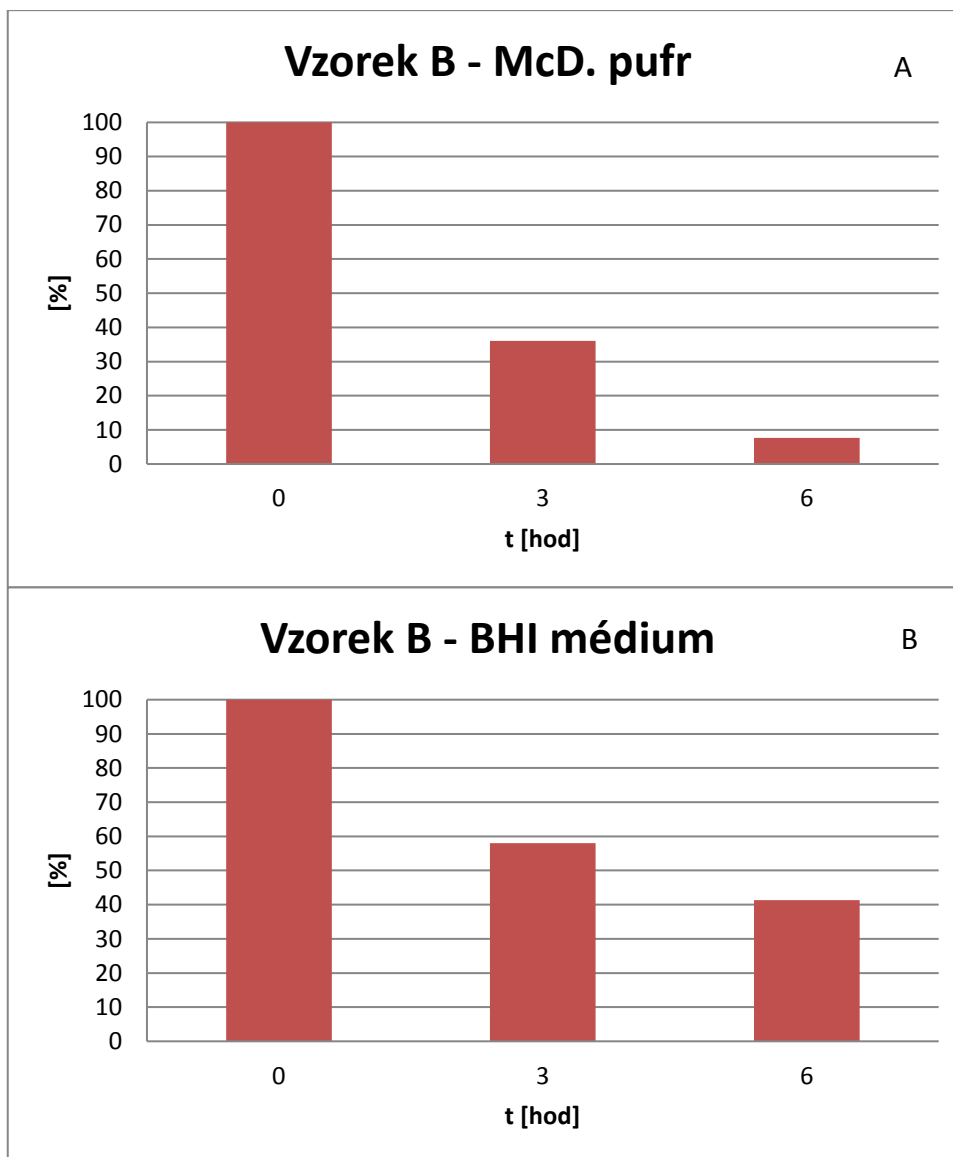
Inkubační směs lidských fekálních bakterií (vzorek B) byla také analyzována metodou RP-HPLC. Vzorek s lidskými fekálními bakteriemi a MYR byl kultivován v McD. pufru a BHI médiu v průběhu 0, 3 a 6 hodin za anaerobních podmínek. Metodou RP-HPLC byla sledována degradace MYR ve vzorku v McD. pufru a BHI médiu. Výsledky měření jsou uvedeny v Tabulce 10. Hodnoty jsou vyjádřeny vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu.

Tabulka 10: Naměřené hodnoty časové degradace MYR ve McD. pufru a BHI médiu se vzorkem B.

Čas [hod]	0	3	6
McD. pufr	287,9	109,5	26,95
	368,1	129,8	23,07
BHI médium	251,7	115,1	86,56
	196,8	144,9	98,76

Legenda: Uvedené hodnoty jsou AUC pro MYR vyjádřené relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu. Hodnoty jsou vynásobeny 100×. Od McD. pufru a BHI média byl pro čas inkubace 0, 3 a 6 hodiny, vzorek analyzován dvakrát metodou RP-HPLC.

Naměřené hodnoty pro McD. pufr a BHI médium byly pro přehlednost zprůměrovány a vztaženy k 100% pro čas inkubace $t = 0$ a jsou zobrazeny na Obrázku 11 (str. 38).



Obrázek 11: Časová závislost degradace MYR. Inkubace MYR se vzorkem fekálních bakterií od dárce B probíhala 0, 3 a 6 hodin v McD. pufru za anaerobních podmínek. Po extrakci ethylacetátem byl analyzován metodou RP-HPLC. Množství MYR je vztaženo na 100% pro čas inkubace $t = 0$. Analýza proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, gradientová eluce, složení mobilní fáze A: 40 % methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100 % methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA) Analýza probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

- **Vzorek C**

Vzorek C je inkubační směs s fekálními bakteriemi a MYR od dárce C. Tato směs byla také analyzována metodou RP-HPLC. Inkubační směs s fekálními bakteriemi a MYR

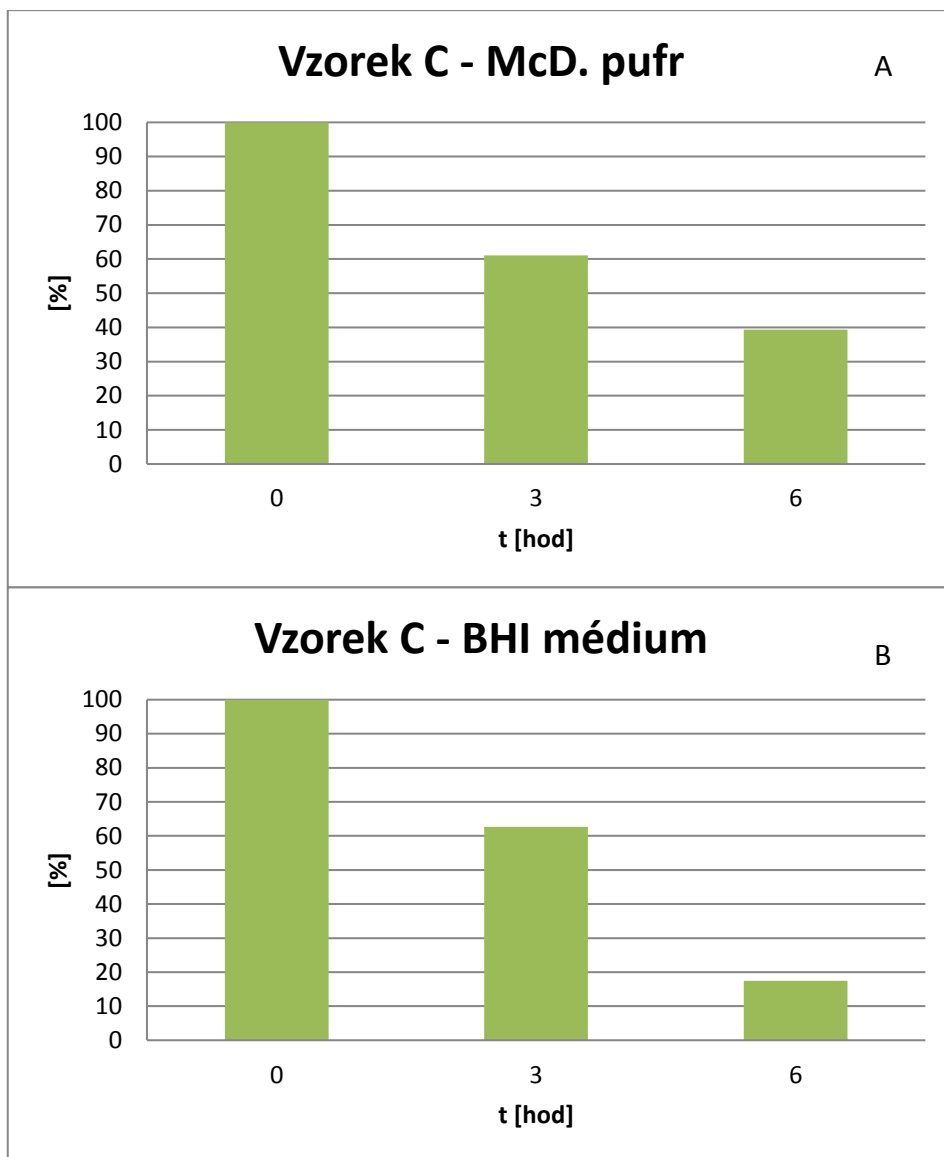
byla kultivována v McD. pufru a BHI médiu během 0, 3 a 6 hodin za anaerobních podmínek. Byla sledována degradace MYR ve vzorku v McD. pufru a BHI médiu. Výsledky analýzy metodou RP-HPLC jsou uvedeny v Tabulce 11 a jsou vyjádřeny relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu.

Tabulka 11: Naměřené hodnoty časové degradace MYR ve McD. pufru a BHI médiu se vzorkem C.

Čas[hod]	0	3	6
McD. pufr	582,8	361,0	205,8
	586,1	352,4	253,5
BHI médium	1064	546,6	196,4
	946,0	712,4	155,0

Legenda: Uvedené hodnoty jsou AUC pro MYR vyjádřené relativně vůči vnitřnímu standardu chlorzoxazonu. Hodnoty jsou vynásobeny 100×. Od McD. pufru a BHI média byl pro čas inkubace 0, 3 a 6 hodiny, vzorek analyzován dvakrát metodou RP-HPLC.

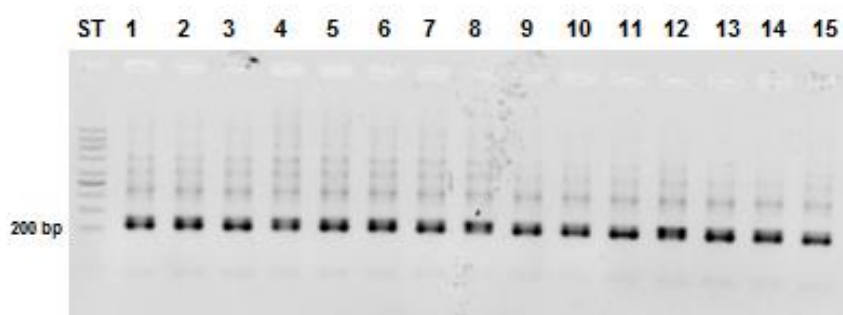
Naměřené hodnoty pro McD. pufr a BHI médium byly pro přehlednost zprůměrovány a vztaženy k 100% pro čas inkubace $t = 0$ a jsou zobrazeny na Obrázku 12 na str. 40.



Obrázek 12: Časová závislost degradace MYR. Inkubace MYR se vzorkem fekálních bakterií od dárce A v čase 0, 3 a 6 hodin v McD pufru (A) a BHI médiu (B) za anaerobních podmínek. Po extrakci ethylacetátem byl analyzován metodou RP-HPLC. Množství MYR je vztaženo na 100% pro čas inkubace $t = 0$. Analýza proběhla na monolitické koloně Chromolith RP-18 E (průtok 1,5 ml/min, tlak 40 barů, gradientová eluce, složení mobilní fáze A: 40 % methanol + 0,1% TFA, fáze B: 100 % methanol, fáze C: ultračistá voda + 0,1% TFA). Analýza probíhala 20 minut při vlnové délce 340 nm.

5.2 Vliv flavonoidů na diverzitu fekálních bakterií

U vzorků stolice byl sledován vliv MYR a DHM na diverzitu populací fekálních bakterií. Izolovaná DNA byla amplifikována metodou PCR, která byla zaměřena na 16S rRNA. Byla pozorována změna složení mikrobiomu u jednotlivých vzorků A, B a C v čase, v důsledku médií, díky expozici MYR nebo DHM. Dále byla zkoumána změna fekálního prostředí v závislosti na přídatku MYR či DHM. U přídatků MYR a DHM byla zároveň pozorována změna mikrobiomu v průběhu inkubace (0, 3, 6, 24 a 72 hodin). Též byl zkoumán vliv rozdílných médií (McD. pufr a BHI médium). Získané PCR produkty byly přečištěny, změřeny koncentrace na NanoDropu One^C. Poté byly PCR produkty zkontrolovány gelovou elektroforézou, jestli došlo k namnožení oblasti 16S rRNA. Ukázka gelu je na Obrázku 13.

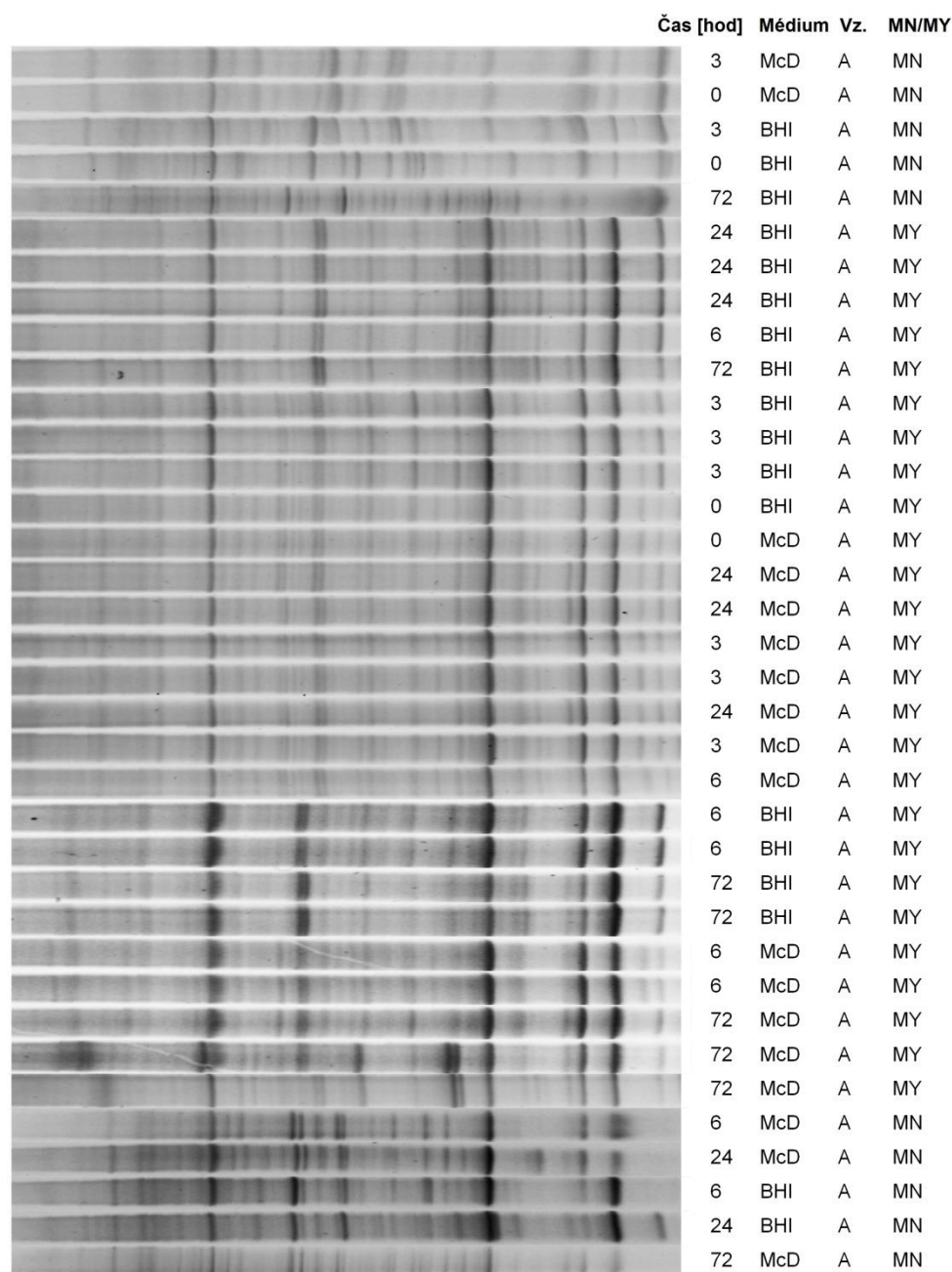


Obrázek 13: Obrázek agarosového gelu po nativní elektroforéze. Dráha ST je se standardním vzorkem DNA, kde je vyznačená část 200 bp, která odpovídá počtu hledaných bází. Dráha 1 – 5 jsou fekální vzorky A s přídatkem MYR v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Dráha 6 – 10 jsou fekální vzorky B s přídatkem MYR v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Dráhy 11 – 15 jsou fekální vzorky C s přídatkem MYR v průběhu inkubace 0, 3, 6, 24 a 72 hodin.

5.2.1 Ovlivnění bakteriální diverzity MYR

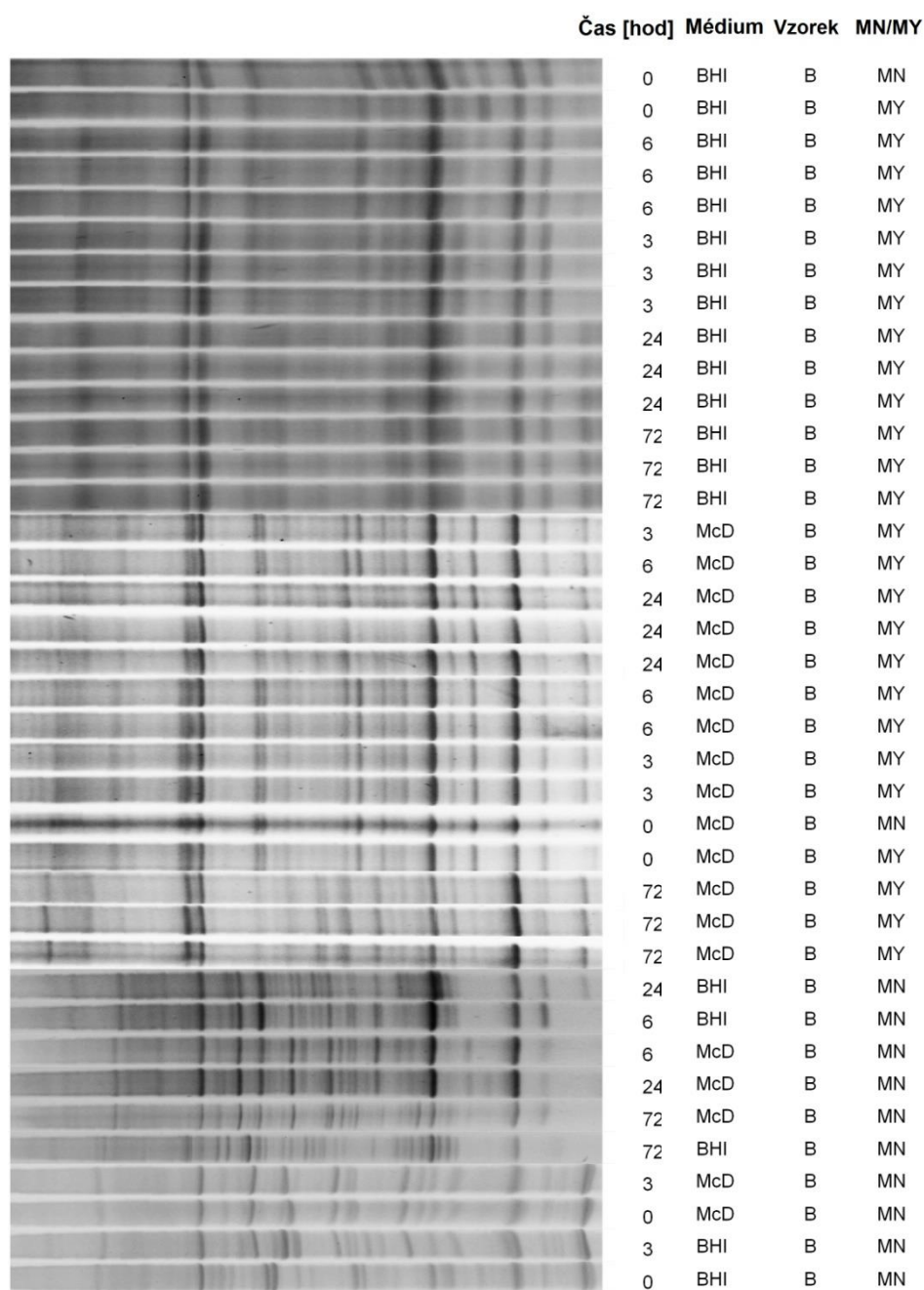
Efekt MYR na fekální bakterie jednotlivých vzorků je zobrazen na fotografiích DGGE gelů. Fotografie na Obrázku 14 (str. 42) znázorňuje vztah mezi MYR a fekálními bakteriemi ve vzorku A. Na Obrázku 15 (strana 43) je fotografie pro vzorek B a na Obrázku 16 (strana 44) pro vzorek C.

- Vzorek A – MYR



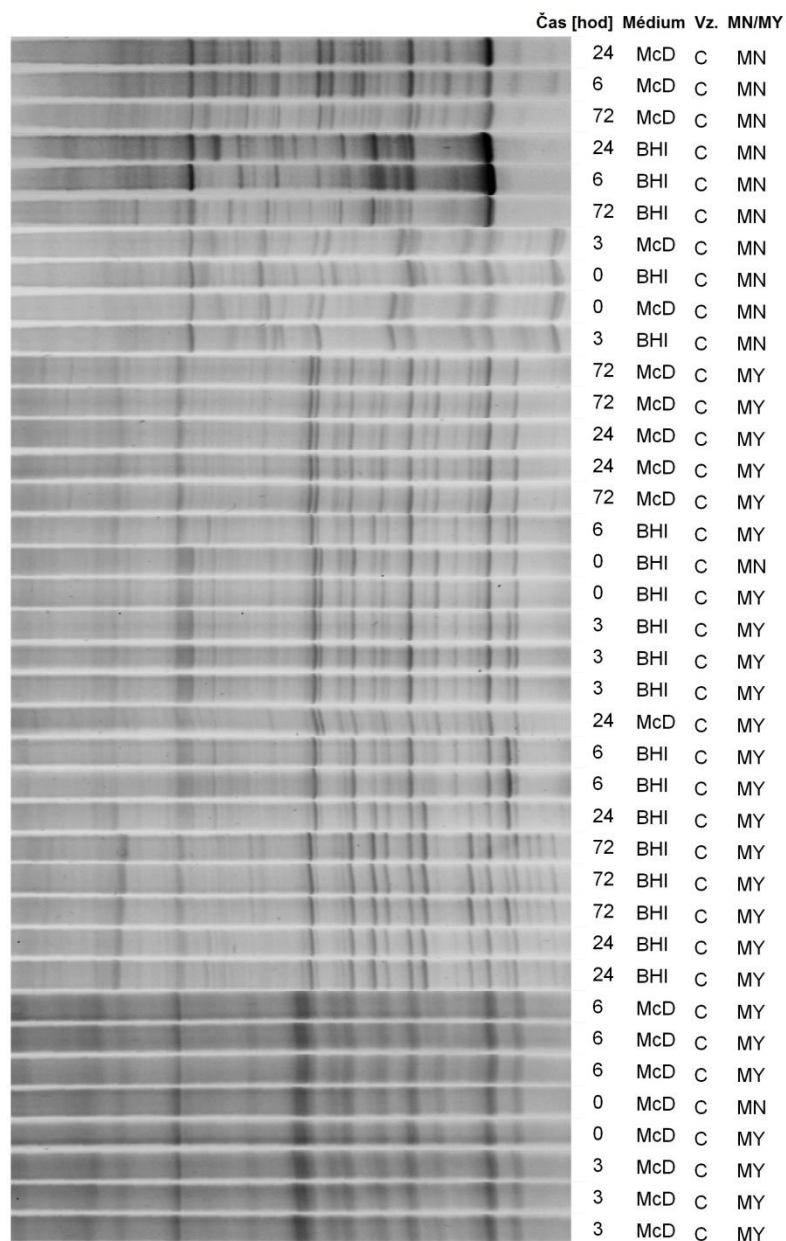
Obrázek 14: Fotografie DGGE gelů vzorku A fekálních bakterií inkubovaný v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s MYR (MY), nebo bez MYR (negativní kontrola, MN) v McD. pufu, nebo BHI médiu.

- Vzorek B – MYR



Obrázek 15: Fotografie DGGE gelů vzorku B fekálních bakterií inkubovaný v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s MYR (MY), nebo bez MYR (negativní kontrola; MN) v McD. pufu, nebo BHI médiu.

- Vzorek C – MYR

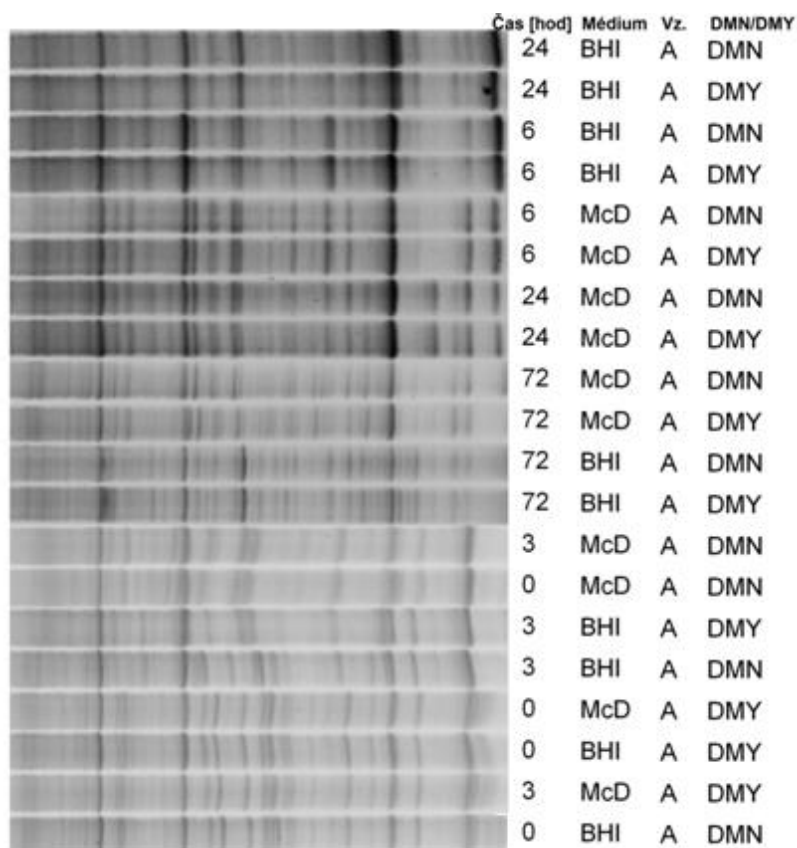


Obrázek 16: Fotografie DGGE gelů vzorku C fekálních bakterií inkubovaný v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s MYR, nebo bez MYR (negativní kontrola) v McD. pufru, nebo BHI médiu.

5.2.2 Ovlivnění bakteriální diverzity DHM

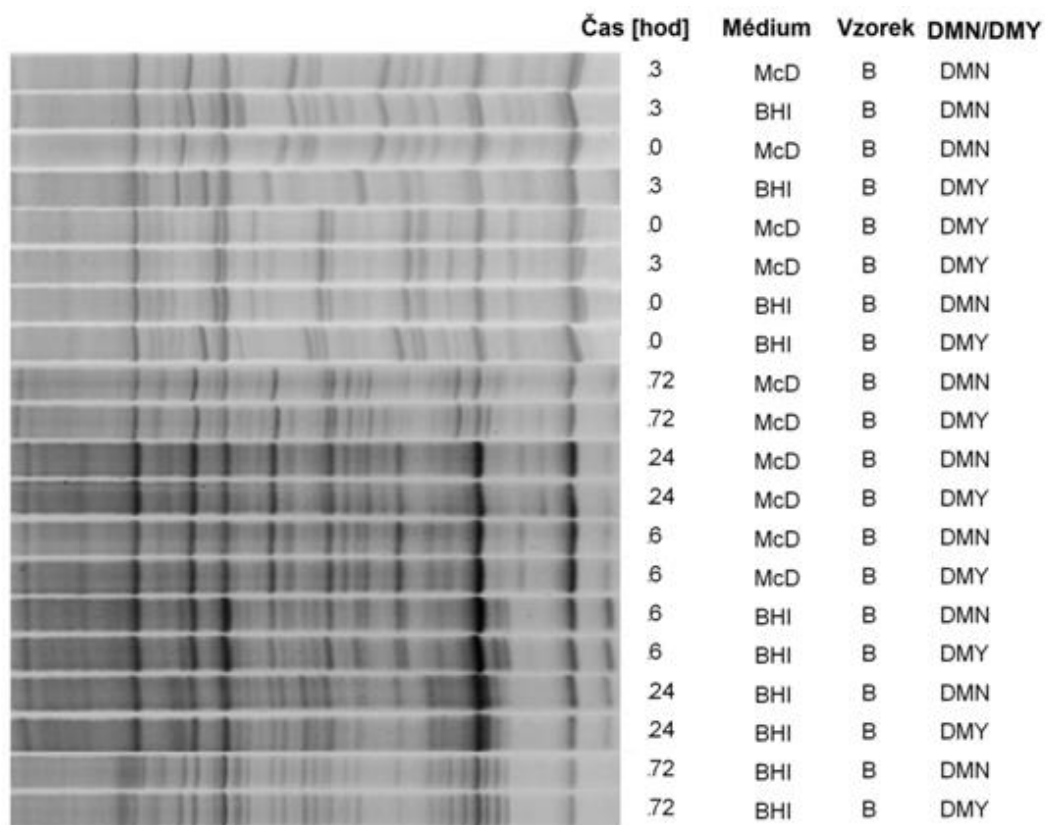
Vztah DHM a fekálních bakterií jednotlivých vzorků je uvedený na fotografiích z DGGE gelů. Fotografie na Obrázku 17 znázorňuje vztah mezi DHM a fekálními bakteriemi u vzorku A. Na Obrázku 18 (strana 46) je fotografie pro vzorek B a na Obrázku 19 (strana 47) pro vzorek C.

- **Vzorek A – DHM**



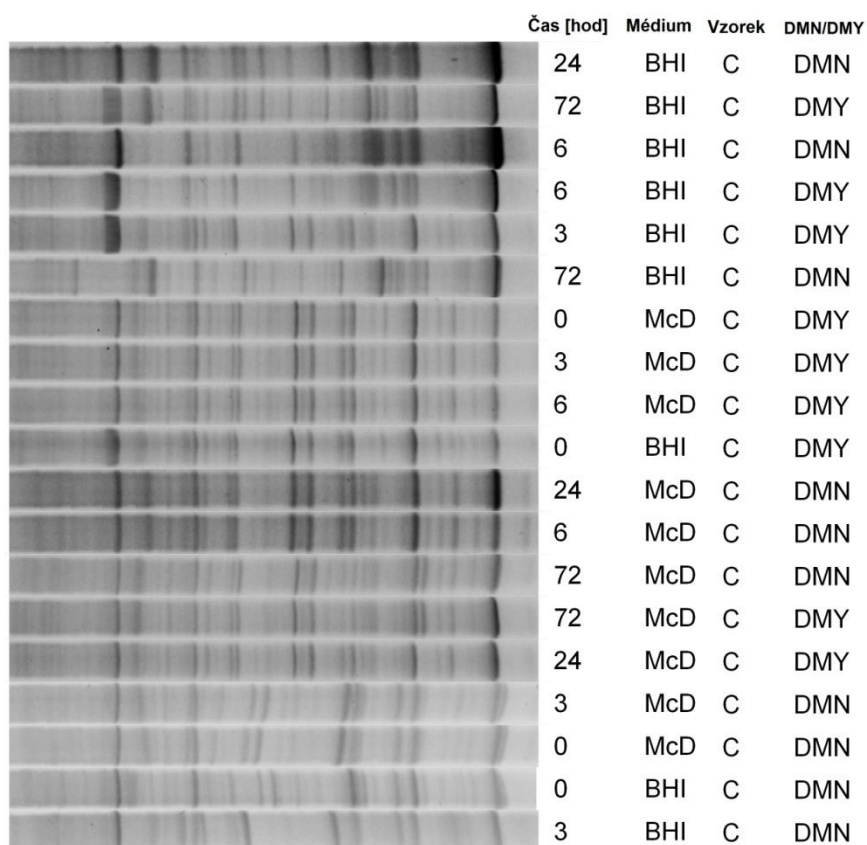
Obrázek 17: Fotografie DGGE gelů vzorku A fekálních bakterií inkubovaný v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s DHM (DMY), nebo bez DHM (negativní kontrola; DMN) v McD. pufru, nebo BHI médiu.

- Vzorku B – DHM



Obrázek 18: Fotografie DGGE gelů vzorku B fekálních bakterií inkubovaný v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s DHM (DMY), nebo bez DHM (negativní kontrola, DMN) v McD. pufu, nebo BHI médiu.

- **Vzorku C – DHM**



Obrázek 19: Fotografie DGGE gelů vzorku C fekálních bakterií inkubovaný v průběhu 0, 3, 6, 24 a 72 hodin s DHM (DMY), nebo bez DHM (negativní kontrola, DMN) v McD. pufru, nebo BHI médiu.

6 Diskuse

Odebrané fekální vzorky A, B a C byly zpracovány a inkubovány s MYR nebo bez MYR v průběhu 0, 3 a 6 hodin. Fekální vzorky byly pro sledování rychlosti degradace MYR připraveny v McD. pufru a BHI médiu za anaerobních podmínek. Metodou RP-HPLC byla na chromatogramech sledována úroveň degradace MYR. Z chromatogramů byl odečten retenční čas MYR ve zkoumaném vzorku a porovnán s retenčním časem MYR ve standardním vzorku. Retenční čas standardního vzorku s MYR byl vždy měřen při probíhajících experimentech. Pro potvrzení, že se analýzou extraktů inkubačních směsí podařilo detekovat MYR, byla detailně porovnána spektra „píků“ analyzovaných vzorků a standardního vzorku MYR. Hodnota vlnové délky absorpčního maxima dané látky byla odečtena při vrcholu spektra a činila 370 ± 3 nm.

Nejprve byla sledovaná rychlost degradace myricetinu ve vzorku A, B a C v inkubační době 0, 3 a 6 hodin v McD. pufru za anaerobních podmínek. Ve fekálním vzorku A a B nebyl pozorován lineární pokles MYR. Střevní bakterie vzorku A po 3 hodinách inkubace degradovaly přibližně 30 % MYR, přičemž po 6 hodinách degradovaly 95 % MYR. Tento rychlý pokles MYR ve vzorku může být způsoben tím, že se fekální bakterie v průběhu 3 hodin množily a k namnožení nevyužívaly MYR, přičemž po namnožení došlo k rychlé degradaci MYR. Ve vzorku B byla po 3 hodinách inkubace pozorována 65% degradace MYR a po 6 hodinách zbylo ve vzorku okolo 8 % MYR. Účinnost degradace MYR ukazuje, že fekální bakterie ve vzorku B využívají MYR pro jejich namnožení. Naopak ve fekálním vzorku C byla pozorována postupná degradace MYR. Po 3 hodinách byla zjištěna 60% degradace MYR a po 6 hodinách inkubace bylo ve vzorku nalezeno okolo 40 % MYR. Tyto výsledky naznačují, že bakterie ve fekálním vzorku C degradují MYR pomalu a k namnožení MYR nevyužívají. Pomalá rychlost degradace může být způsobena i tím, že fekální vzorek C obsahuje bakterie, které pro namnožení potřebují živiny, a ty v McD. pufru nejsou.

Úroveň degradace MYR ve fekálním vzorku A, B a C v průběhu 0, 3 a 6 hodin byla sledována i v BHI médiu. V tomto médiu lze pozorovat, že bakterie fekálního vzorku A rychleji degradují MYR než v McD. pufru. Po 3 hodinách inkubace bylo ve fekálním vzorku nalezeno okolo 25 % MYR a po 6 hodinách 10 % MYR. Fekální vzorek B po 3 hodinách inkubace obsahoval přibližně 60 % MYR a po 6 hodinách ještě 40 % MYR.

Vzorek B se rychlostí degradace MYR v BHI médiu podobá fekálnímu vzorku C, ve kterém bylo po 3 hodinách nalezeno také okolo 60 % MYR, přičemž po 6 hodinách vzorek obsahoval pouze 20 % MYR.

Rozdílná úroveň degradace MYR ve fekálním vzorku A může být způsobena tím, že se bakterie tohoto vzorku lépe namnožily v BHI médiu, a že jich bylo v inkubované směsi více než v McD. pufru. Na rozdílný počet namnožených bakterií v kultivovaných inkubačních směsích za anaerobních podmínek může mít také vliv to, že BHI médium je oproti McD. pufru bohaté na živiny. Bakterie ve fekálním vzorku B vykazují rychlejší degradaci MYR ve McD. pufru než v BHI médiu. Může to být způsobeno tím, že tyto bakterie pro namnožení v McD. pufru využívaly MYR a v BHI médiu netrpěly nedostatkem živin, proto MYR degradují pomalu. Oproti tomu fekální vzorek C vykazoval přibližně stejné rychlosti degradace MYR, jak v McD. pufru, tak i v BHI médiu.

V žádných z analyzovaných vzorků metodou RP-HPLC nebyl nalezen DHM. Je pravděpodobné, že MYR není redukován na DHM. V práci [61] také nebyl nalezen žádný metabolit odpovídající DHM. Přestože se stále jedná o velmi malý počet vzorků lze s větší pravděpodobností předpokládat, že MYR nemůže být metabolizován lidskou střevní mikroflórou na DHM za použitých experimentálních podmínek. Toto tvrzení ovšem nemusí být obecně platné, jelikož jak už bylo uvedeno výše, metabolismus cizorodých látek střevní mikroflórou je velmi složitý proces. Bakterie v každé střevní mikroflóře jsou rozdílné a jsou ovlivňovány vnějšími vlivy. Je možné, že bakterie, které dokážou metabolizovat MYR, se nevyskytovaly v analyzovaných vzorcích, ale mohou se nacházet v jiné části střeva. Ve zkoumaných vzorcích nebyly nalezeny ani žádné jiné metabolity při 340 nm, jako tomu bylo u daidzeinu, kde byl po konzumaci sójových bobů ve fekálních vzorcích dobrovolníků nalezen metabolit dihydrodaidzein, equol, nebo *O*-DMA [37]. Kromě DHM by bylo možné získat jiné metabolity, například fenolické kyseliny, které byly detekovány v pokusech s quercetinem [40].

Dále byl pozorován vliv MYR a DHM na diverzitu bakteriálních populací. Růst či úbytek bakteriálních kmenů ve fekálních vzorcích byl sledován v čase 0, 3, 6, 24 a 72 hodin v McD. pufru a BHI médiu za anaerobních podmínek. Při porovnání fekálních vzorků bez MYR (negativní kontrola, MN) inkubované v McD. pufru je patrný nárůst určitých zón v čase, nebo naopak úbytek (Obr. 14, 15, 16, str. 42-44). U negativní kontroly fekálního vzorku A (Obr. 14, str. 42) v čase 6 hodin a 24 hodin je patrný nárůst zóny.

Ve fekálním vzorku B je také viditelný přírůstek a úbytek zón v průběhu inkubace. To samé je patrné i ve fekálním vzorku C. V BHI médiu je pozorována změna zón u všech fekálních vzorků (A, B, C). Velké změny v nárůstu a úbytku jsou patrné až po 24 hodinách inkubace.

Ve vzorku A při inkubaci s MYR jsou sledovány zesílené zóny a nárůst zón v BHI médiu. Úbytek zón v BHI médiu není patrný. Zóny pozorované v BHI médiu v McD. pufru vidět nejsou. Přičemž v McD. pufru byla nalezena zóna v čase inkubace 72 hodin, která se nenachází v BHI médiu a ani v negativní kontrole. Ve fekálním vzorku B je viditelné zesílení a nárůst zón. V McD. pufru je pozorováno více zón, než v BHI médiu. V čase 72 hodin v McD. pufru je sledován úbytek a přírůstek odlišných zón oproti času inkubace 0 hodin. Ve fekálním vzorku B dochází především k úbytku zón v čase 6 hodin jak v McD. pufru, tak i v BHI médiu (Obr. 15, str. 43). Ve vzorku stolice C jsou také viditelné změny s přidavkem MYR. Ve fekálním vzorku C bez MYR jsou zóny především v horní části gelu. Oproti tomu ve vzorcích s MYR dochází k úbytku těchto zón a přírůstku zón ve spodní části gelu. Tento efekt je nezávislý na čase a použitém médiu.

Při porovnání fekálních vzorků A, B a C s přidavkem DHM byly patrné změny v průběhu inkubace. Ve vzorku A v čase inkubace 6 hodin v BHI médiu se objevila zóna navíc oproti vzorku v čase inkubace 24 hodin. V McD. pufru byly objeveny zóny navíc v čase inkubace 24 hodin oproti času inkubace 6 hodin. Ovšem tyto vzorky obsahovaly více zón, než bylo nalezeno ve vzorku inkubovaném 72 hodin. Ve vzorku B byly nalezeny také rozdílné zóny jak v časech inkubace, tak i mezi McD. pufrům a BHI médiem. Ve vzorku C byl také pozorován tento efekt.

Na Obr. 14 (str. 42), 15 (str. 43), 16 (str. 44), 17 (str. 45), 18 (str. 46) a 19 (str. 47) je pozorováno, že v průběhu inkubace (0, 3, 6, 24 a 72 hodin) došlo ke změnám. K nárůstu a úbytku zón docházelo ve všech fekálních vzorcích (A, B, C). Změna je pozorovatelná především v čase inkubace 24 a 72 hodin.

Změna bakteriálních zón ve vzorcích může souviset s bohatostí BHI média na živiny nebo naopak s nedostatkem živin v McD. pufru. Tento efekt může být také způsoben přítomností flavonoidních látek v inkubovaných směsích. Přítomnost flavonoidů na růst fekálních bakterií byl pozorován u quercetinu, katechinu a puerarinu. Tyto látky také měly vliv na energetický metabolismus bakterií. Docházelo k inhibici růstu bakterií

z kmene *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. Naopak stimulaci růstu vykazovaly bakterie z kmene *Aktinobakterie* [64].

7 Souhrn

- Metodou RP-HPLC byla ověřena degradace myricetinu fekálními bakteriemi. Dále bylo zjištěno, že fekální bakterie vzorku A, B i C nepřeměnily myricetin na dihydromyricetin.
- Metodou PCR-DGGE bylo zjištěno, že myricetin i dihydromyricetin ovlivňuje růst fekálních bakterií. Toto ovlivnění je patrné především při inkubační době 72 hodin.

8 Seznam literatury

- [1] G. L. Simon, S. L. Gorbach, „Intestinal Microflora", *Med. Clin. North Am.*, roč. 66, č. 3, str. 557–574, **1982**.
- [2] E. A. Grice a kol., „Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome", *Science*, roč. 324, č. 5931, str. 1190–1192, **2009**.
- [3] S. J. Song, M. G. Dominguez-Bello, R. Knight, „How delivery mode and feeding can shape the bacterial community in the infant gut", *CMAJ*, roč. 185, č. 5, str. 373–374, **2013**.
- [4] G. Biasucci, M. Rubini, S. Riboni, L. Morelli, E. Bessi, C. Retetangos, „Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut", *Early Hum. Dev.*, roč. 86, č. 1, str. 13–15, **2010**.
- [5] V. D'Argenio, F. Salvatore, „The role of the gut microbiome in the healthy adult status", *Clin. Chim. Acta*, roč. 451, str. 97–102, **2015**.
- [6] P. J. Turnbaugh, V. K. Ridaura, J. J. Faith, F. E. Rey, R. Knight, J. I. Gordon, „The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice", *Sci. Transl. Med.*, roč. 1, č. 6, str. 6–14, **2009**.
- [7] T. Human Microbiome Project Consortium, „Structure, function and diversity of the healthy human microbiome", *Nature*, roč. 486, č. 7402, str. 207–214, **2012**.
- [8] G. Gorkiewicz, A. Moschen, „Gut microbiome: A new player in gastrointestinal disease", *Virchows Arch.*, roč. 472, č. 1, str. 159–172, **2018**.
- [9] W. E. C. Moore, L. V Holdeman, „Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians", *Appl. Microbiol.*, roč. 27, č. 5, str. 961–979, **1974**.
- [10] E. Thursby, N. Juge, „Introduction to the human gut microbiota", *Biochem. J.*, roč. 474, č. 11, str. 1823–1836, **2017**.
- [11] A. Suau a kol., „Direct Analysis of Genes Encoding 16S rRNA from Complex Communities Reveals Many Novel Molecular Species within the Human Gut", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 65, č. 11, s. 4799–4807, **1999**.
- [12] G. Muyzer, E. C. De Waal, A. G. Uitterlinden, „Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA", *Appl. Environ. Microbiol.*, roč. 59, č. 3, str. 695–670, **1993**.
- [13] M. J. Hill, „Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis", *Eur. J. Cancer Prev.*, roč. 6, č. 1, str. S43–S45, **1997**.
- [14] G. den Besten, K. van Eunen, A. K. Groen, K. Venema, D.-J. Reijngoud, B. M. Bakker, „The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism", *J. Lipid Res.*, roč. 54, č. 9, str. 2325–2340, **2013**.

- [15] S. Sivaprakasam, P. D. Prasad, N. Singh, „Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis", *Pharmacol. Ther.*, č. 164, str. 144–151, **2016**.
- [16] S. Fukiya a kol., „Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces", *FEMS Microbiol. Lett.*, roč. 293, č. 2, str. 263–270, **2009**.
- [17] H. Okuda, K. Ogura, Kato, H. Takubo, T. Watabe, „A possible mechanism of eighteen patient deaths caused by interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs.", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, roč. 287, č. 2, str. 791–799, **1998**.
- [18] P. Spanogiannopoulos, E. N. Bess, R. N. Carmody, P. J. Turnbaugh, „The microbial pharmacists within us: A metagenomic view of xenobiotic metabolism", *Nat. Rev. Microbiol.*, roč. 14, č. 5, str. 273–287, **2016**.
- [19] H. J. Haiser, P. J. Turnbaugh, „Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism", *Pharmacol. Res.*, roč. 69, č. 1, str. 21–31, **2013**.
- [20] O. V Arkhipova, V. K. Akimenko, „Unsaturated Organic Acids as Terminal Electron Acceptors for Reductase Chains of Anaerobic Bacteria", *Microbiology*, roč. 74, č. 6, str. 629–639, **2005**.
- [21] M. A. Peppercorn, P. Goldman, „The role of intestinal bacteria in the metabolism of salicylazosulfapyridine", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, roč. 181, č. 3, str. 555–562, **1972**.
- [22] M. Ouzzine a kol., „The UDP-glucuronosyltransferases of the blood-brain barrier: their role in drug metabolism and detoxication", *Front Cell Neurosci*, roč. 8, str. 349, **2014**.
- [23] H. Tlaskalová-Hogenová a kol., „The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases.", *Cell. Mol. Immunol.*, roč. 8, č. 2, str. 110–120, **2011**.
- [24] S. R. Modi, J. J. Collins, D. A. Relman, „Antibiotics and the gut microbiota.", *J. Clin. Invest.*, roč. 124, č. 10, str. 4212–4218, **2014**.
- [25] L. Dethlefsen, S. Huse, M. L. Sogin, D. A. Relman, „The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing.", *PLoS Biol.*, roč. 6, č. 11, str. 280, **2008**.
- [26] C. Ferrier Maurice, H. J. Haiser, P. J. Turnbaugh, „Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome", *Cell*, roč. 152, č. 1–2, str. 39–50, **2013**.
- [27] F. Bä Ckhed, J. K. Manchester, C. F. Semenkovich, J. I. Gordon, „Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, roč. 104, č. 3, str. 979–984, **2007**.
- [28] V. Kapatral a kol., „Genome sequence and analysis of the oral bacterium

- Fusobacterium nucleatum* strain ATCC 25586.", *J. Bacteriol.*, roč. 184, č. 7, str. 2005–2018, **2002**.
- [29] L. Zhou a kol., „Gut Microbe Analysis Between Hyperthyroid and Healthy Individuals", *Curr. Microbiol.*, roč. 69, č. 5, str. 675–680, **2014**.
 - [30] A. Khoruts, J. Dicksved, J. K. Jansson, M. J. Sadowsky, „Changes in the Composition of the Human Fecal Microbiome After Bacteriotherapy for Recurrent *Clostridium Difficile*-associated Diarrhea", *J. Clin. Gastroenterol.*, roč. 44, č. 5, str. 354–360, **2009**.
 - [31] H. N. Shah, D. M. Collins, „NOTES: *Prevotella*, New Genus To Include *Bacteroides melaninogenicus* and Related Species Formerly Classified in the Genus *Bacteroides*", *Int. J. Syst. Bacteriol.*, roč. 40, č. 2, str. 205–208, **1990**.
 - [32] P.G. Pietta, „Flavonoids as Antioxidants", *J. Nat. Prod.*, roč. 63, č. 7, str. 1035–1042, **2000**.
 - [33] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, „Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses", *Food Chem.*, roč. 99, č. 1, str. 191–203, **2006**.
 - [34] Z. P. Xiao, Z. Y. Peng, M. J. Peng, W. B. Yan, Y. Z. O., H. L. Zhu, „Flavonoids Health Benefits and Their Molecular Mechanism", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, roč. 11, č. 2, str. 169–177, **2011**.
 - [35] K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, D. J. Bobilya, „Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships", *J. Nutr. Biochem.*, roč. 13, č. 10, str. 572–584, **2002**.
 - [36] S. Nishiumi a kol., „Dietary flavonoids as cancer-preventive and therapeutic biofactors.", *Front. Biosci. (Schol. Ed.)*, roč. 3, č. 4, str. 1332–1362, **2011**.
 - [37] F. Rafii, C. Davis, M. Park, T. M. Heinze, R. D. Beger, „Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals", *Arch. Microbiol.*, roč. 180, č. 1, str. 11–16, **2003**.
 - [38] P. Hollman, M. Katan, „Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man", *Biomed. Pharmacother.*, roč. 51, č. 8, str. 305–310, **1997**.
 - [39] M. G. L. Hertog, P. C. H. Hollman, M. B. Katan, „Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands", *J. Agric. Food Chem.*, roč. 40, č. 12, str. 2379–2383, **1992**.
 - [40] A. Serra, A. Macià, M. P. Romero, J. Reguant, N. Ortega, M. J. Motilva, „Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids", *Food Chem.*, roč. 130, č. 2, str. 383–393, **2012**.
 - [41] K. Murota, J. Terao, „Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism", *Arch. Biochem. Biophys.*, roč. 417, č. 1, str. 12–17, **2003**.
 - [42] V. D. Bokkenheuser, C. H. L. Shackleton, J. Winter, „Hydrolysis of dietary

- flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans", *Biochem. J.*, roč. 248, č. 3, str. 953–956, **1987**.
- [43] Z. Zhang, X. Peng, S. Li, N. Zhang, Y. Wang, „Isolation and Identification of Quercetin Degrading Bacteria from Human Fecal Microbes", *PLoS One*, roč. 9, č. 3, str. 90531, **2014**.
 - [44] K.-S. Park, Y. Chong, M. K. Kim, „Myricetin: biological activity related to human health", *Appl. Biol. Chem.*, roč. 59, č. 2, str. 259–269, **2016**.
 - [45] J. R. Jones a kol., „The Diarylheptanoid (+)-aR,11S-Myricanol and Two Flavones from Bayberry (*Myrica cerifera*) Destabilize the Microtubule Associated Protein Tau NIH Public Access", *J Nat Prod*, roč. 74, č. 1, s. 38–44, **2011**.
 - [46] I. Umadevi, M. Daniel, S. D. Sabnis, „Chemotaxonomic studies on some members of Anacardiaceae", *Proc. Plant Sci.*, roč. 98, č. 3, str. 205–208, **1988**.
 - [47] A. Mohamed Abd El-kader a kol., „Pharmaceutical Biology Polyphenols from aerial parts of *Polygonum bellardii* and their biological activities ", *Pharm. Biol.*, roč. 51, č. 8, str. 1026–1034, **2013**.
 - [48] L. Suan Chua, N. Abdul Latiff, S. Yean Lee, C. Tin Lee, M. Roji Sarmidi, R. Abdul Aziz, „Flavonoids and phenolic acids from *Labisia pumila* (Kacip Fatimah)", *Food Chem.*, roč. 127, č. 3, str. 1186–1192, **2011**.
 - [49] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, L. Jiménez, „Polyphenols: food sources and bioavailability", *Am J Clin Nutr*, roč. 79, str. 727–774, **2004**.
 - [50] K. C. Ong, H. E. Khoo, „Biological effects of myricetin", *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.*, roč. 29, č. 2, str. 121–126, **1997**.
 - [51] D. K. Semwal, R. B. Semwal, S. Combrinck, A. Viljoen, „Myricetin: A dietary molecule with diverse biological activities", *Nutrients*, roč. 8, č. 2, str. 90, **2016**.
 - [52] Wu CD, L. Cai, „Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens", *J. Nat. Prod.*, roč. 59, č. 10, str. 987–990, **1996**.
 - [53] J. Ye, Y. Guan, S. Zeng, D. Liu, „Ampelopsin Prevents Apoptosis Induced by H₂O₂ in MT-4 Lymphocytes", *Planta Med.*, roč. 74, č. 3, str. 252–257, **2008**.
 - [54] T. Kundaković a kol., „Cytotoxic, antioxidant, and antimicrobial activities of *Ampelopsis brevipedunculata* and *Parthenocissus tricuspidata* (Vitaceae)", *Arch. Biol. Sci.*, roč. 60, č. 4, str. 641–647, **2008**.
 - [55] X. Kou, N. Chen, „Pharmacological potential of ampelopsin in Rattan tea", *Food Sci. Hum. Wellness*, roč. 1, str. 14–18, **2012**.
 - [56] T. Hyun, S. Eom, C. Yu, T. Roitsch, „*Hovenia dulcis* – An Asian Traditional Herb", *Planta Med.*, roč. 76, č. 10, str. 943–949, **2010**.
 - [57] Y. Shen a kol., „Dihydromyricetin As A Novel Anti-Alcohol Intoxication Medication", *JNEUROSCI*, roč. 32, č. 1, str. 390–401, **2012**.

- [58] S. Wu, B. Liu, Q. Zhang, J. Liu, W. Zhou, „Dihydromyricetin Reduced Bcl-2 Expression via p53 in Human Hepatoma HepG2 Cells", *PLoS One*, roč. 8, č. 11, str. 76886, **2013**.
- [59] E. I. McDougall, „The composition and output of sheep's saliva", *Biochem. J.*, roč. 43, č. 1, str. 99–109, **1948**.
- [60] M. P. Bryant, L. A. Burkey, „Cultural Methods and Some Characteristics of Some of the More Numerous Groups of Bacteria in the Bovine Rumen", *J. Dairy Sci.*, roč. 36, č. 3, str. 205–217, **1953**.
- [61] A. Hušková, „Interakce střevní mikroflóry s myricetinem", Bakalářská práce katedra biochemie PřF UK, **2017**.
- [62] G. Muyzer, K. Smalla, „Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology", *Antonie Van Leeuwenhoek*, roč. 73, č. 1, str. 127–141, **1998**.
- [63] C. Fujimoto a kol., „Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of microbial communities of subgingival plaque", *J. Periodontal Res.*, roč. 38, č. 4, str. 440–445, **2003**.
- [64] B. Xue a kol., „Plant polyphenols alter a pathway of energy metabolism by inhibiting fecal Bacteroidetes and Firmicutes in vitro", *Food Funct.*, roč. 7, č. 3, str. 1501–1507, **2016**.
- [65] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction“, *Biotechnology*, roč. 51, str. 263–273, **1986**.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení Adresa	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka